



**THAÍS OLIVEIRA RAMALHO**

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE  
ISOLADOS DE *Potato virus Y* (PVY) E  
DETERMINAÇÃO DO SEU EFEITO EM  
PLANTAS DE BATATA cv. *Ágata***

**LAVRAS - MG**

**2012**

**THAÍS OLIVEIRA RAMALHO**

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS DE *Potato virus Y*  
(PVY) E DETERMINAÇÃO DO SEU EFEITO EM PLANTAS DE  
BATATA cv. *Ágata***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia, área  
de concentração em Fitopatologia,  
para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Antonia dos Reis Figueira

**LAVRAS - MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Ramalho, Thaís Oliveira.

Caracterização genômica de isolados de *Potato virus Y* (PVY) e determinação do seu efeito em plantas de batata cv. Ágata / Thaís Oliveira Ramalho. – Lavras : UFLA, 2012.

89 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. Caracterização biológica. 2. Caracterização molecular. 3. Hipersensibilidade. 4. Teste sorológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.8

**THAÍS OLIVEIRA RAMALHO**

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE ISOLADOS DE *Potato virus Y*  
(PVY) E DETERMINAÇÃO DO SEU EFEITO EM PLANTAS DE  
BATATA cv. Ágata**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia, área  
de concentração em Fitopatologia,  
para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de fevereiro de 2012.

Dr. Mário Sobral de Abreu UFLA

Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto UFLA

Dra. Antonia dos Reis Figueira  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2012**

A Deus,  
por me permitir chegar até aqui,

### **OFEREÇO**

*Aos meus pais, Miguel e Icleuza, pelos ensinamentos, paciência, conselhos, compreensão e amor. Ao meu sobrinho Alvaro e às minhas irmãs, Aline e Denise, pelo companheirismo. A Clara, pela amizade incondicional e à vó Elvira, pelo carinho.*

### **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, por todos esses anos de acolhimento. Ao CNPq e à FAPEMIG, pela concessão de bolsas de estudos.

À professora Dra. Antonia dos Reis Figueira, pela orientação, amizade, compreensão, ensinamentos, paciência e confiança.

Aos funcionários e professores do DFP/UFLA, pela contribuição na construção da base do meu conhecimento. Aos professores Mario Sobral e César Brasil (DBI), pela participação na banca e disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Aos amigos do Centro de Indexação de Vírus, em especial Lúcia, Elisângela Jaciara e Carzinho, pela ajuda.

Ao pessoal da Virologia Vegetal, Priscila, Bárbara, João Eduardo, André, João Ronaldo, Nara, Anderson, Mauricio, Douglas, Dani, Jessica, Matheus e a Danielle, pela paciência.

À turma do mestrado de 2010/1, em especial aos amigos Davi e Leandro, por tornarem essa etapa da minha vida mais alegre.

Às amigas Heloísa e Elise, por estarem sempre ao meu lado.

A Silvia Regina, pela amizade e por toda ajuda nesses sete anos maravilhosos de convivência.

A Suellen Bárbara, pela paciência, pelo carinho, pelos ensinamentos, pela dedicação e amizade.

Chegar até aqui sem vocês seria praticamente impossível.

**MUITO OBRIGADA**

## RESUMO

O *Potato virus Y* (PVY) era originalmente dividido em três principais grupos de estirpes, denominadas de PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>C</sup>, porém, devido ao constante aparecimento de novas variantes genéticas, novas estirpes têm sido propostas, como PVY<sup>E</sup> e PVY<sup>Z</sup>. Dentro de cada um desses grupos de estirpes, existe ainda uma grande variabilidade, o que torna esse vírus um dos mais difíceis de serem controlados. Algumas cultivares de batata, como a 'Ágata', são mais resistentes e, às vezes, se apresentam assintomáticas no campo, dependendo do isolado e das condições ambientais. Neste trabalho, 26 isolados de PVY, coletados em diferentes localidades de Minas Gerais, foram caracterizados por meio de métodos biológicos, sorológicos e moleculares e inoculados mecanicamente na batata cv. Ágata, que é uma das mais plantadas no Brasil, para investigar a reação dessa cultivar durante três gerações sucessivas. Na caracterização biológica, esses isolados foram inoculados mecanicamente em plantas de batata com 'background' genético conhecido e em plantas de fumo. Posteriormente, foram realizados TAS-ELISA com anticorpos monoclonais e RT-PCR multiplex. Além desses 26 isolados coletados, mais 5 isolados, pertencentes à Coleção de Vírus do Laboratório de Virologia da UFLA, foram inoculados em plantas de batata cv. Ágata e os sintomas avaliados em três gerações consecutivas. Dos 26 isolados, um deles, o DMO-AG-1, foi classificado como PVY<sup>O</sup>, por induzir reação de HR nas cultivares Maris Bard e Desiree e pelos resultados sorológicos e de RT-PCR. O isolado MF-AG-52 se portou de maneira diferente da esperada, apresentando reação para anticorpo monoclonal PVY<sup>O</sup> e padrão de bandas específico para PVY<sup>NTN</sup> no RT-PCR. Sete isolados foram classificados como PVY<sup>N-Wi</sup> e os restantes como PVY<sup>NTN</sup>. Quando inoculados na cv. Ágata, dos 31 isolados testados, cinco não induziram sintoma de mosaico: AD-AG-2 (PVY<sup>N-Wi</sup>), ALF-VI, MF-AG-105 e SGOT-AR (PVY<sup>NTN</sup>), e os demais induziram sintomas que variaram de mosaico leve a severo, dependendo da geração. Dois isolados pertencentes ao grupo PVY<sup>N-Wi</sup>, sendo um que não induziu sintoma AD-AG-2 e outro que induziu sintoma, tiveram o seu genoma completamente sequenciado e comparados entre si e com outros isolados do *GenBank*. O mesmo foi feito com dois isolados de PVY<sup>NTN</sup> já sequenciados anteriormente. Não foi possível correlacionar a indução ou não de sintomas com diferenças no genoma desses isolados.

Palavras-chave: Caracterização biológica. Teste sorológico. Hipersensibilidade. Caracterização molecular.

## ABSTRACT

The Potato virus Y (PVY) was originally divided into three main groups of strains, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup> and PVY<sup>C</sup>. Due to the constant new genetic variants arising, new strains have been proposed as PVY<sup>E</sup> and PVY<sup>Z</sup>. Within each of these groups of strains, there is still a great variability which makes this virus one of the most difficult to be controlled. Some potato cultivars, such as Ágata, are more resistant and sometimes they are asymptomatic in the field, depending on the environmental conditions and isolate. In this work, 26 isolates of PVY were collected at different sites in Minas Gerais, characterized by biological, serological and molecular methods, and mechanically inoculated in potato cv. Ágata, one of the most cultivated in Brazil, to investigate this cultivar reaction for three successive generations. In biological characterization, potato plants with known genetic background and tobacco plants were mechanically inoculated with these 26 isolates. Then, TAS-ELISA with monoclonal antibodies and multiplex RT-PCR were carried out. In addition to these 26 strains, five isolates belonging to the virus collection of the Virology Lab from UFLA in potato plants cv. Ágata and the symptoms were evaluated in three consecutive generations. One of the 26 isolates, the DMO-AG-1, was classified as PVY<sup>O</sup>, by inducing HR reaction in cvs. Maris Bard and Desiree and by serological and RT-PCR results. The strain MF-AG-52 behaves different than expected, reacting to PVY<sup>O</sup> monoclonal antibody and showing specific standard bands to PVY<sup>NTN</sup> in RT-PCR assay. Seven isolates were classified as PVY<sup>N-Wi</sup> and the others as PVY<sup>NTN</sup>. Four of the 31 isolates tested, do not induced mosaic symptom when inoculated in cv. Ágata: AD-AG-2 (PVY<sup>N-Wi</sup>), ALF-VI, MF-AG-105 and SGOT-AR (PVY<sup>NTN</sup>), and the others induced symptoms that ranged from medium to severe mosaic, depending on the generation. Two isolates belonging to PVY<sup>N-Wi</sup> group, one not inducing symptom: AD-AG-2, and another that induced had their genome completely sequenced and compared with each other and with others isolates from GenBank. The same was done with two isolates from PVY<sup>NTN</sup> group previously sequenced. It was unable to correlate the induction of symptoms or not with differences in the genome of these isolates.

Keywords: Biological characterization. Serological test. Hypersensitivity. Molecular characterization.



## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Importância econômica do PVY na bataticultura</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b><i>Potato virus Y</i> (PVY)</b> .....	15
<b>2.2.1</b>	<b>Caracterização molecular</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Estirpes do <i>Potato virus Y</i></b> .....	18
<b>2.3.2</b>	<b>Variantes da estirpe necrótica do PVY</b> .....	21
<b>2.3.3</b>	<b>PVY<sup>NTN</sup> e cultivar Ágata</b> .....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
	<b>CAPÍTULO 2 Caracterização de isolados de <i>Potato virus Y</i></b> <b>(PVY) detectados em Minas Gerais</b> .....	38
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
<b>2.1</b>	<b>Condução dos experimentos</b> .....	42
<b>2.2</b>	<b>Obtenção e armazenamento dos isolados</b> .....	42
<b>2.3</b>	<b>Inoculação mecânica em plantas indicadoras</b> .....	44
<b>2.4</b>	<b>Caracterização sorológica dos isolados</b> .....	45
<b>2.5</b>	<b>Identificação das estirpes/variantes via RT-PCR</b> .....	46
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	48
<b>3.1</b>	<b>Caracterização biológica baseada nos sintomas induzidos em plantas indicadoras</b> .....	48
<b>3.2</b>	<b>Caracterização sorológica e molecular</b> .....	53
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63
	<b>CAPÍTULO 3 Comportamento da cultivar Ágata a diferentes estirpes e variantes de <i>Potato virus Y</i> (PVY)</b> .....	66
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	68
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	71
<b>2.1</b>	<b>Condução dos experimentos</b> .....	71
<b>2.2</b>	<b>Origem, denominação e armazenamento dos isolados</b> .....	71
<b>2.3</b>	<b>Sintomatologia induzida na cultivar Ágata pelos diferentes variantes de PVY</b> .....	73
<b>2.4</b>	<b>Sequenciamento completo do genoma de isolados de PVY</b> .....	74
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	76
<b>3.1</b>	<b>Sintomatologia induzida nas plantas da cv. Ágata pelas estirpes/ variantes de PVY estudados</b> .....	76
<b>3.2</b>	<b>Sequenciamento e análise dos genomas</b> .....	78

4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	85
5	<b>CONCLUSÕES.....</b>	87
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	88

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) é amplamente distribuída no Brasil, sendo os estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná os maiores produtores (ANUÁRIO..., 2011). Entretanto, nessas regiões, as temperaturas de inverno são amenas, raramente baixando a ponto de reduzir significativamente a população de afídeos, fazendo com que insetos vetores de vírus permaneçam ativos durante todo ano. Isso faz com que as doenças viróticas sejam de grande relevância para esta cultura, destacando-se o enrolamento da folha da batata, causado pelo *Potato leafroll virus* (PLRV), o mosaico, causado pelo *Potato virus Y* (PVY) e as infecções latentes, causadas pelo *Potato virus S* (PVS) e *Potato virus X* (PVX), que se tornam importantes quando associados ao PLRV e PVY.

O PVY é um dos patógenos de plantas mais importantes economicamente e está entre os cinco vírus que mais causam danos em campos de produção de vegetais (KERLAN et al., 2011; LOEBENSTEIN et al., 2001; MILNE, 1988). Atualmente, o PVY é considerado o vírus responsável por maior queda de produtividade na cultura da batata, devido, principalmente, à introdução de estirpes com maior capacidade de disseminação nos campos produtores (FIGUEIRA et al., 1996). Ávila et al. (2009), analisando a ocorrência de viroses em lavouras de batata, em sete estados brasileiros, constataram que o PVY apareceu como o vírus de maior importância, com até 100% de incidência, enquanto PLRV e PVS atingiram incidência máxima de 25%.

O PVY pertence ao gênero *Potyvirus*, que é o maior e o mais importante dentro da família *Potiviridae*, infectando diversas plantas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. Este gênero é constituído por vírus transmitidos por afídeos e que possuem apenas um componente genômico (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005; FAUQUET et al., 2005; REGENMORTEL et al., 2000).

O principal sintoma associado ao PVY é denominado de “mosaico”, devido às diferentes tonalidades de verde observadas nas folhas das plantas infectadas por estes vírus. É comum que, antes do aparecimento do mosaico característico, ocorra clorose internerval, que indica a multiplicação do vírus na planta. Outros sintomas, que também podem ocorrer, são necrose e deformação foliar, porém, é importante ressaltar que os sintomas são influenciados por fatores ambientais, estirpe e concentração do vírus, genótipo e idade da planta infectada (KERLAN et al., 2011; LE ROMANCER; KERLAN; NEDELLEC, 1994).

Singh et al. (2008) descreveram cinco estirpes de PVY: PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>Z</sup> e PVY<sup>E</sup>, com base na interação dessas estirpes com genes de resistência e sintomas de necrose ou mosaico em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (BLANCO-URGOITI et al., 1998; BOKX; HUTTINGA, 1981; JONES, 1990; KERLAN et al., 1999; LORENZEN et al., 2006). As estirpes mais conhecidas e com maior distribuição geográfica são o PVY<sup>O</sup>, conhecido como estirpe comum, que causa mosaico sistêmico e é elicitor do gene *NY*; o PVY<sup>N</sup>, estirpe necrótica que causa mosaico e necrose em plantas de fumo e o PVY<sup>C</sup>, que provoca resposta de hipersensibilidade em plantas de batata que possuem o gene *Nc*, sintoma conhecido como “stipple streak”. Ainda são conhecidos variantes da estirpe necrótica, como, por exemplo, PVY<sup>N-Wi</sup>, PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>NE-11</sup>.

Nem todas as cultivares de batata hoje comercializadas apresentam sintomas quando infectadas pelo PVY, como é o caso da cultivar Ágata. Esta cultivar é a mais plantada no Brasil, por apresentar características que agradam aos produtores, como tamanho e formato dos tubérculos, ciclo precoce e elevado rendimento e não apresenta sintomas característicos quando infectada por algumas estirpes do PVY. Essas plantas assintomáticas apresentam uma vantagem em termos de produtividade, porém, podem ocasionar prejuízos inesperados, além de se tornar fonte de inóculo no campo, que é facilmente transmitida por afídeos (BOKX; HUTTINGA, 1981). Como esse vírus é transmitido de modo não persistente ou estiletar, e tem o *Myzus persicae* como o vetor mais eficiente (SIGVALD, 1984; VERBEEK et al., 2009), o seu controle no campo por meio de inseticidas tem eficiência limitada.

Com o objetivo de caracterizar os isolados de PVY e analisar sua relação com a batata cultivar Ágata, realizou-se um levantamento dos isolados presentes em maior incidência e com maior frequência no campo nas principais regiões produtoras de Minas Gerais. Todos os isolados foram caracterizados biologicamente, incluindo a inoculação de cultivares de batata com “background” genético conhecido, submetidos a testes sorológicos utilizando anticorpos monoclonais e policlonais e testes moleculares. Quatro isolados foram selecionados para o sequenciamento completo de seus genomas, com a finalidade de inferir sobre possíveis regiões genômicas relacionadas com a reação sintomatológica da planta de batata cv. Ágata.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Importância econômica do PVY na bataticultura**

Dentre os alimentos mais consumidos no mundo, a batata ocupa o terceiro lugar em ordem de importância, devido, principalmente, à sua versatilidade. A produção mundial da cultura, em 2010, foi de aproximadamente 320 milhões de toneladas, sendo a China o maior produtor, com 72 milhões de toneladas, e o Brasil, com 3.459.183 toneladas (ANUÁRIO..., 2011). Segundo essa mesma fonte, Minas Gerais é o principal estado produtor, contribuindo com 33% da produção nacional.

Devido às condições climáticas favoráveis no Brasil, a batata pode ser cultivada durante o ano inteiro, em diferentes regiões (VECHI; HIRANO, 1984), em três safras distintas, conhecidas como safra “das águas”, “da seca” e “de inverno”. A safra “das águas” ocorre no período de agosto a dezembro, principalmente com plantios nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e São Paulo, sendo esta a mais expressiva. A safra “da seca” ocorre no período de dezembro a abril e a safra “de inverno”, de abril a julho (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010).

A batata pode ser afetada por diversos tipos de fitopatógenos, como fungos, bactérias, nematoides e vírus, e o fato de ser propagada vegetativamente, somado às condições climáticas brasileiras, torna os vírus patógenos de grande importância, causando a degenerescência devido ao acúmulo destes nos tubérculos. Daniel et al. (2002), avaliando a degenerescência das cultivares Elvira, Catucha, Monalisa e Baronesa, observaram que a incidência viral na primeira geração variava de 7,5% a 42% e na terceira geração variou de 35% a 64%, mostrando como é rápida a

degenerescência dos tubérculos nas condições edafoclimáticas brasileiras. Outros autores afirmam que as perdas causadas por vírus podem variar de 10% a 100% (ANDRADE; FIGUEIRA, 1991; BOKX; BUS, 1996; BOKX; HUTTINGA, 1981; KUS, 1995).

Os vírus frequentemente associados a quedas na produção de batata, em ordem de importância, são *Potato virus Y* (PVY), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Potato virus S* (PVS) e *Potato virus X* (PVX) (DANIELS, 1995; FIGUEIRA, 1995). Câmara, Cupertino e Filgueira (1986) constataram redução de até 50% na produtividade em lavouras infectadas pelo PLRV, que é conhecido como vírus do enrolamento da folha, por causar este sintoma em plantas de batata. Em razão da introdução, no Brasil, de uma estirpe de PVY mais agressiva, o quadro epidemiológico das viroses foi mudado, passando este a ser o principal vírus associado à degenerescência da batata no país (FIGUEIRA, 1999).

Um levantamento realizado em lotes de batata semente no estado de Minas Gerais mostrou que, no ano de 1995, dos 365 lotes analisados, 12% foram condenados, representando 14% da área plantada. Em 1997, foram condenados cerca de 28% dos lotes, o que equivale a 20% da área plantada. Em 1998, os valores de condenação foram paralelos aos do ano anterior, reduzindo em 2001. De 2002 a 2005, 31% da área plantada foi condenada, sendo o PVY o principal causador das condenações (GERALDINO et al., 2006).

Pesquisas recentes sobre a condenação de lotes de batata semente analisados em Minas Gerais, na última década, indicaram que houve um decréscimo em relação à condenação dos lotes por PLRV, de 1,78%, 0,4%, 1,8% e 0,4%, nos últimos quatro anos, enquanto o PVY foi responsável pela condenação de 12,5%, 13,9%, 17,4% e 7,7%, no mesmo período, reafirmando a importância econômica do PVY nesta região (JESUS et al., 2010).

## 2.2 *Potato virus Y (PVY)*

A família *Potiviridae* é a de maior importância dentro do grupo dos fitovírus. Ela abrange aproximadamente 20% dos vírus conhecidos, incluindo o *Potato virus Y (PVY)*, membro-tipo do gênero *Potyvirus* (FAUQUET et al., 2005; REGENMORTEL et al., 2000) que foi descrito pela primeira vez na Inglaterra, por Smith, em 1931 (BOKX; HUTTINGA, 1981; BRUNT et al., 1996).

Os *Potyvirus* causam sintomas que podem variar com a idade das plantas infectadas, a concentração viral e os fatores ambientais, mas, de modo geral, induzem mosaico, mosqueado, clorose acompanhada de necrose e deformação foliar, além da combinação desses sintomas (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994).

O PVY é um patógeno importante não só para a cultura da batata, mas também para outras solanáceas cultivadas, como tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pimentão (*Capsicum* spp.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002).

Segundo Romero et al. (2001), isolados de PVY que infectam campos de produção de pimentão, geralmente, não causam infecção sistêmica em batata. Do mesmo modo, isolados de PVY de batata têm uma capacidade limitada de infectar plantas de pimentão. Os autores sugerem que isolados de PVY que infectam o pimentão causam sintomas mais leves em plantas de fumo (cv. Xanthi), quando comparados aos sintomas causados pelo vírus Y isolado de batata. Em contrapartida, isolados de PVY oriundos de batata e pimentão, que não apresentam diferenças biológicas, infectam facilmente tomate e fumo, tornando os critérios de distinção destes isolados mais trabalhosos (SCHUBERT et al., 2007). Moury (2010) sugere que a adaptação do vírus ao



pimentão (*Capsicum* spp.) e à batata foi modificada várias vezes durante a história evolutiva.

Este vírus pode ser transmitido por métodos mecânicos, enxertia e por insetos vetores, dentre os quais o *Myzus persicae* é o mais eficiente. A transmissão por afídeos é do tipo não persistente ou estiletar, ou seja, o vírus está associado ao estilete do inseto, podendo ser adquirido em um breve período de tempo e inoculado imediatamente após a aquisição, e a retenção do vírus no estilete do inseto é limitada a um curto período (BOKX, 1987). Diferentes espécies de afídeos podem transmitir o vírus com grau variado de eficiência, dependendo da espécie do vetor e da estirpe do PVY. Já foram relatadas cerca de 70 espécies de afídeos vetores deste vírus (BOITEAU et al., 1988; BOKX; HUTTINGA, 1981; BOKX; PIRON, 1990; GIBSON; PAYNE; KATINS, 1988; KOSTIW, 1979; ORLANDO; SIBERSCHMIDT, 1945; POWELL; HARRISON; SPILLER, 1992; SIGVALD, 1984). Verbeek et al. (2009) confirmam a alta eficiência do *M. persicae* na transmissão do PVY e ainda afirmam que este vetor transmite, com a mesma eficácia, os variantes PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N-Wi</sup>. Da mesma forma, não foi observada diferença na transmissibilidade pelo *M. persicae* entre PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N-Wi</sup> (MELLO et al., 2011).

### 2.2.1 Caracterização molecular

O PVY é composto por uma única partícula de RNA em seu genoma, sendo esta de fita simples, infecciosa, alongada, flexível, medindo em torno de 730 nm de comprimento e 11 nm de diâmetro, com um orifício central de 2-3 nm de diâmetro, contendo, em média, 9,7 Kb (BOKX; HUTTINGA, 1981; HOLLINGS; BRUNT, 1981). O genoma viral é ligado covalentemente a uma VPg, no terminal 5' e a uma cauda poli A na extremidade 3' (Figura 1).



Figura 1 Esquema do genoma do PVY

Até pouco tempo atrás, era conhecida apenas uma única unidade codificadora traduzível (“open reading frame” - ORF), cuja tradução origina uma poliproteína pesando aproximadamente 350 kDa, que é posteriormente processada por três proteases, contidas em sua própria sequência, originando dez proteínas funcionais. Porém, recentemente, foi descoberta uma nova ORF de tamanho reduzido, incorporada à ORF maior, mais precisamente na região P3, e possui, provavelmente, a mesma função da proteína P3 (CHUNG et al., 2008).

A proteína denominada P1 exerce função de protease, atua na sintomatologia e na movimentação célula a célula; a proteína HC-PRO tem a função de transmissão por afídeos, protease, movimentação sistêmica do vírus, autointeração, sintomatologia e supressão do silenciamento gênico; a P3, patogenicidade na planta e replicação; a CI atua na replicação do genoma, ATPase/RNA helicase e movimento célula a célula; a proteína 6K2 tem a função de ancoramento do complexo de replicação viral na membrana da célula; a VPg age na replicação do genoma e na especificidade em relação ao hospedeiro; a NIa-Pro age na localização celular, na proteinase e na interação proteína-proteína; a NIb RNA é polimerase dependente de RNA e também está envolvida na replicação do genoma; a 6K1 não teve ainda sua função elucidada e, por fim, a CP atua na transmissão por afídeos, no movimento célula a célula, na montagem da partícula viral e replicação viral (URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001), além das regiões 5' e 3' não traduzíveis (5'NTR e 3'NTR).

### 2.3 Estirpes do *Potato virus Y*

Isolados do PVY apresentam-se diferentes com relação à patogenicidade e à sintomatologia em diferentes espécies hospedeiras, à sorologia e aos dados moleculares, propriedades estas que estão, em parte, relacionadas à filogenia do PVY (BOKX; HUTTINGA, 1981; GÉBRÉ-SELASSIE et al., 1985; GOODING; TOLIN, 1973). A nomenclatura das estirpes deste vírus tem sido dividida com base, especialmente, em sua capacidade ou não de induzir necrose em diferentes cultivares de batata ou em fumo, quando inoculadas experimentalmente (SINGH et al., 2008).

Os primeiros estudos de resistência em batatas em relação ao PVY mostraram uma herança do tipo monogênica dominante (HUTTON, 1945; JONES, 1990). Dessa forma, o uso de cultivares diferenciais torna possível a distinção entre as estirpes com base na resposta de hipersensibilidade. Baseando-se nesta reação de HR, Singh et al. (2008) propuseram cinco estirpes de PVY, que são: PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>E</sup> e PVY<sup>Z</sup>, que estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 Estirpes, sinônimos e definição do PVY

Estirpes	Variantes	Sinônimos	Definição
PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>O</sup>	PBY <sup>O5</sup>	Estirpe <i>Common</i> ou <i>ordinary</i> , elicitores do gene <i>NY</i>
PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>EU-N</sup> , PVY <sup>NA-N</sup> , NA-PVY <sup>N</sup> , PVY <sup>R</sup> , PVY <sup>TVN</sup>	Estirpe <i>Tobacco vein necrosis</i> , isolados que não causam PTNRD
PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	EU-PVY <sup>NTN</sup> , Eu-PVY <sup>NTN</sup> , PVY <sup>EU-NTN</sup> , PVY <sup>NN</sup> , PVY <sup>NA-NTN</sup> , NA-PVY <sup>NTN</sup>	PVY <sup>N</sup> isolados capazes de causar PTNRD
PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>	PVY <sup>N-Wilga</sup> , PVY <sup>N-W</sup> , PVYN-Wi-P, PVY <sup>N:O</sup>	Isolados recombinantes, fenotipicamente PVY <sup>N</sup> , mas sorologicamente PVY <sup>O</sup>
PVY <sup>C</sup>	PVY <sup>C</sup>	PVY <sup>C1</sup> , PVY <sup>C2</sup>	Estirpe C, elicitor do gene <i>Nc</i>
PVY <sup>Z</sup>	PVY <sup>Z</sup>		Estirpe Z, elicitor do proposto gene <i>Nz</i>
PVY <sup>E</sup>	PVY <sup>E</sup>	PVY <sup>ZE</sup>	Estirpe E, isolados que não são elicitores dos genes <i>Ny</i> , <i>Nc</i> e <i>Nz</i> e não causam necrose em tabaco.

Fonte: Singh et al. (2008)

A estirpe PVY<sup>O</sup> (*ordinary strain*) induz reação de hipersensibilidade em cultivares de batata que possuem o gene *Nytr*, como a ‘Desiree’ e ‘Maris Bard’ (BOKX; HUTTINGA, 1981; JONES, 1990; KARASEV et al., 2011; KERLAN et al., 1999; SINHG et al., 2008). De maneira geral, em batata e em fumo (*Nicotiana tabacum* L.), essa estirpe causa mosaico com diferentes intensidades e em *Physalis floridana*, causa desfolha. Embora o PVY<sup>O</sup> seja mais relatado na América do Norte, sua distribuição é cosmopolita (BANTTARI et al., 1993) e sua descrição no Brasil ocorreu, pela primeira vez, em 1939 (SILBESCHMIDT; NOBREGA; KRAMER, 1941; SOUZA-DIAS, 2001).

O PVY<sup>C</sup> (*common strain*) induz reação de necrose sistêmica “stipple-streak” em cultivares de batata que carregam o gene *Nc*, como, por exemplo, a ‘King Edward’ (COCKERHAM, 1945, 1970; KERLAN et al., 2011). Esta estirpe é dividida em dois grupos, C1 e C2, de acordo com a capacidade ou não

de infectar pimentão cv. Yolo Wonder, respectivamente. Tem capacidade de ser transmitido pelo afídeo *M. persicae*, porém, essa transmissibilidade é restrita a apenas alguns isolados do PVY<sup>C</sup>, o que, possivelmente, justifica sua distribuição geográfica limitada (BLANCO-URGOITI et al., 1998). Essa estirpe já foi relatada na Austrália, na Europa, na Nova Zelândia e nas Américas (LORENZEN et al., 2006). No Brasil, essa estirpe não foi encontrada em plantações comerciais, até o momento (ÁVILA; MELO; LEITE, 2007; DANIELS, 2000).

Na década de 1980, na Espanha, os genomas de dois isolados de PVY apresentaram-se muito semelhante à estirpe PVY<sup>N</sup>, porém, reagiam sorologicamente ao PVY<sup>O</sup> e não causavam necrose em folhas de fumo (BLANCO-URGOITI et al., 1998). Esse novo grupo de PVY também foi descrito como sendo capaz de superar tanto o gene *Nytr* quanto *Nc*, mas causava HR em cultivares que carregam um gene hipotético denominado *Nz*, presente em cultivares como ‘Pentland Ivory’ e ‘Maris Bard’ (JOHNSTON; ROWBERRY, 1981). Essa estirpe foi então denominada PVY<sup>Z</sup>. Mais tarde, um novo grupo, denominado PVY<sup>E</sup>, caracterizou-se como sendo capaz de superar os genes *Nytr*, *Nc* e *Nz*, e também não causar necrose em tabaco (KERLAN et al., 1999). A incidência, a distribuição geográfica e a importância do PVY<sup>Z</sup> e PVY<sup>E</sup> nunca foram estudadas, porém, recentemente, dois isolados encontrados no Brasil, denominados PVY-AGA e PVY-MON, coletados em Minas Gerais e São Paulo, respectivamente, foram classificados como PVY<sup>E</sup> (GALVINO-COSTA et al., 2011).

A estirpe PVY<sup>N</sup> (*necrotic strain*) não induz reação de HR em batatas que possuem o gene *Ny* e *Nc*, porém, induz necrose sistêmica em plantas de fumo e não provoca desfolha em *Physalis*. Esta estirpe foi registrada na Europa, na América do Sul e na América do Norte (ELLIS; STACE-SMITH; VILLEERS, 1997). No Brasil, foi detectada em lotes de batata-semente

oriundos da Argentina (SOUZA-DIAS, 1998). Pode ser transmitida por insetos e o *M. persicae* é o mais eficiente. Recentemente, foi relatada sua transmissão por outros afídeos, como *Aphis frangulae* e *Phorodon humuli*, porém, com menor eficiência (VERBEEK et al., 2009).

De modo geral, o PVY pode ser separado em dois grupos sorológicos, utilizando anticorpos monoclonais. O primeiro grupo, PVY<sup>O:C</sup> ou PVY<sup>O</sup> sorotipo C, inclui o PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup> e PVY<sup>N-Wi</sup> (NIE; SINGH, 2003). O segundo grupo, denominado PVY<sup>N</sup> ou sorotipo N, inclui o PVY<sup>N</sup> e o PVY<sup>NTN</sup> (CHIKH ALI; MAOKA; NATSUAKI, 2007). Porém, recentemente, um terceiro grupo sorológico foi descrito para isolados de PVY<sup>O</sup> portadores de uma mutação pontual em seu genoma, localizada no nucleotídeo A-1,627, o qual foi substituído por um G-1,627, o que ocasionou uma mudança de aminoácido de D-205 para G-205, na região terminal da Hc-Pro. Acredita-se que essa substituição seja a responsável pela identificação desses isolados pelo anticorpo monoclonal 1F5 (ELLIS; STACE-SMITH; VILLEERS, 1996; KARASEV et al., 2010) anteriormente relatado como específico apenas para isolados pertencentes ao sorotipo N. Dessa forma, esses isolados de PVY<sup>O</sup> foram classificados como PVY<sup>O-O5</sup> e reagem positivamente para os anticorpos específicos do grupo sorológico O e também ao anticorpo específico do grupo N, 1F5 (Agdia) (KARASEV et al., 2010).

### **2.3.2 Variantes da estirpe necrótica do PVY**

Os sintomas variáveis causados pelo PVY se devem ao fato de este vírus possuir alta variabilidade genética dentro da espécie. Essa grande variabilidade ocorre devido à associação de segmentos genômicos e também por meio de fenômenos como mutação e recombinação, que resultam no surgimento de novas estirpes e, ainda, de variantes genéticas também

denominados subgrupos, capazes de acarretar perdas consideráveis na produção (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002).

Na década de 1980, novos isolados de PVY<sup>N</sup> foram relatados na Hungria, causando sintomas atípicos de anéis necróticos nos tubérculos de batata (*potato tuber necrotic rinspot disease*, PTNRD). Esse sintoma inicia-se com o aparecimento de manchas escuras na superfície dos tubérculos, que se expandem formando arcos e anéis, que evoluem, desenvolvendo lesões deprimidas na superfície dos tubérculos. Isolados que apresentaram esse sintoma foram, então, classificados como sendo um variante da estirpe necrótica do PVY denominado PVY<sup>NTN</sup> (BECZENER et al., 1984). Sabe-se, hoje, que este variante pode ainda causar enrolamento apical em cultivares suscetíveis (SILVA, 2008). Sua ocorrência foi relatada em vários países da Europa (Alemanha, Áustria, Bélgica, Dinamarca, França, Holanda e Polônia) (BECZNER et al., 1984; KERLAN; LE ROMANCER, 1992; KUS; 1995; STEINBACH; HAMANN, 1989), no Líbano (LE ROMANCER; KERLAN; NEDELLEC, 1994), na América do Norte (NIE; SINGH; SINGH, 2004; PICHE et al., 2004) e no Japão. No Brasil, foi descrito pela primeira vez por Souza-Dias, em 1996 e notificado ao Ministério da Agricultura em 1997, pelo Instituto Agrônomo de Campinas (SOUZA-DIAS; TRISTÃO, 1997).

O surgimento do PVY<sup>NTN</sup>, possivelmente, é decorrente de eventos de recombinação entre os genomas de PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N</sup>, e os pontos de recombinação estão presentes nas regiões HC-Pro/P3/CI/6K<sub>1</sub>, 6K<sub>2</sub>/NIa e CP/3'NTR (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002).

Outro variante do PVY<sup>N</sup>, denominado PVY<sup>N-Wi</sup>, foi detectado em 1984, na Polônia (CHRZANOWSKA, 1991). Posteriormente, isolados similares foram relatados na América do Norte, denominados PVY<sup>N:O</sup> (MCDONALD; SILVA, 1996; PICHE et al., 2004). Sing et al. (2008) propuseram um único nome para essa variante de PVY<sup>N-Wi</sup>, que abrange os acrônimos PVY<sup>N-Wilga</sup>,

PVY<sup>N-W</sup>, PVY<sup>N-Wi-P</sup> e PVY<sup>N:O</sup>. Nos últimos anos, isolados desta estirpe vêm sendo encontrados em várias regiões da América do Norte (XIANZHOU; SINGH, 2003) e também já foram relatados no Brasil (FIGUEIRA et al., 2009).

Este variante é derivado, possivelmente, da recombinação entre duas estirpes, pois análise da sequência do genoma da região da CP do PVY<sup>N-Wi</sup> mostra pontos de recombinação com o PVY<sup>O</sup> e da proteína P1 com PVY<sup>N</sup> (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002; MCDONALD; KRISTJANSSON, 1993). A diferenciação entre o PVY<sup>O</sup> e o PVY<sup>N-Wi</sup> pode ser feita por meio de anticorpo monoclonal para PVY<sup>O</sup> (XIANZHOU; SINGH, 2003) visto que esse subgrupo é incapaz de reagir com anticorpo monoclonal para PVY<sup>N</sup> (CHRZANOWSKA, 1991, 1994). Outra característica deste variante é a capacidade de induzir necrose em folhas de fumo, sintoma típico do PVY<sup>N</sup>. Porém, Barker et al. (2009) observaram que alguns isolados do PVY<sup>N-Wi</sup> também são capazes de causar anéis necróticos nos tubérculos de batata.

O PVY<sup>NE-11</sup> representa um novo variante do PVY<sup>N</sup> e possui o genoma intermediário entre PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NA/NTN</sup>. Por meio de comparação de sequências de nucleotídeos da CP, o NE-11 apresentou 99,7% de similaridade com isolados de PVY<sup>N</sup> e causou sintomas de mosaico leve em folhas de batata, sendo característico do PVY<sup>O</sup> (LORENZEN et al., 2008).

Recentemente, foi detectado, na Síria, um proposto novo variante de PVY denominado PVY<sup>NTN-NW</sup>, que compartilha sequências genômicas do PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N-Wi</sup>. Este variante tem sido amplamente encontrado em campos de produção de batata naquele. O PVY<sup>NTN-NW</sup> induz necrose internerval em fumo e reage com anticorpo monoclonal para PVY<sup>O</sup>, característica típica de PVY<sup>N-Wi</sup>, porém, causa PTNRD em tubérculos, fenótipo relacionado ao PVY<sup>NTN</sup> (CHIKH ALI; MAOKA; NATSUAKI, 2010).



Atualmente, novos isolados do variante NTN foram identificados nos Estados Unidos, Dinamarca, Nova Zelândia, Alemanha, Polônia e Japão, que foram associados ao sintoma PTNRD, mas que não apresentavam pontos de recombinação na região CP (BOONHAM et al., 2002; OGAWA et al., 2008; SCHUBERT et al., 2007). Alguns desses isolados não foram detectados pelo conjunto de *primers* desenhados para PVY<sup>NTN</sup> europeu (EU-PVY<sup>NTN</sup>) (WEIDEMANN; MAISS, 1996) e foram então denominados PVY<sup>NTN</sup> norte-americanos (NA-PVY<sup>NTN</sup>) (WEILGUNY; SINGH, 1998).

Singh et al. (2008) propuseram o agrupamento do EU-PVY<sup>NTN</sup> e do NA-PVY<sup>NTN</sup>, de forma a serem denominados PVY<sup>NTN</sup>. Esse agrupamento foi proposto não só com base em dados moleculares, mas também na sintomatologia, na patogenicidade e na distribuição geográfica, entre outras características (Tabela 1). No ano de 2006, foi constatada a presença do variante EU-PVY<sup>NTN</sup> na América do Norte (LORENZEN et al., 2006).

Rabelo Filho (2008), estudando diversos isolados de PVY em Minas Gerais, observou que 50% desses isolados eram do tipo PVY<sup>NTN</sup>, ressaltando a importância deste vírus para esta região. O mesmo foi expresso por Camargos (2009), que constatou que isolados que causavam anéis necróticos em tubérculos pertenciam ao variante PVY<sup>NTN</sup>. Ávila et al. (2009), analisando os variantes e estirpes do PVY em Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Santa Catarina, Paraná e Goiás, constataram a presença do PVY<sup>N</sup> em todos esses estados e que mais de 80% da incidência do PVY era causada pela estirpe NTN. Além do mais, por meio de análise sintomatológica, foi possível a diferenciação de dois isolados do variante NTN. Estes dois isolados, quando inoculados nas cultivares Mondial, Monalisa e Canoinhas, apresentaram sintomas diferentes. Um isolado apresentou sintomas típicos de encrestamento, enquanto o outro induziu apenas mosaico com manchas cloróticas.

Sawazaki et al. (2009) caracterizaram um isolado de PVY<sup>NTN</sup> registrado no estado de São Paulo, em campo de produção de batata cv. Monalisa. Esse isolado, denominado IAC-PVY<sup>NTN</sup>, teve a sequência de nucleotídeos da capa proteica e da proteína P1 analisados e foi diagnosticado como um isolado recombinante entre isolados europeus/norte-americanos, que compartilham um local de recombinação na região CP. Dessa forma, o IAC-PVY<sup>NTN</sup> pode representar uma relação entre isolados do Brasil, da Europa e norte-americanos, evidenciando uma possível origem comum para PVY<sup>N / NTN</sup> da Europa e do Brasil.

Na China foi relatada, pela primeira vez, a presença de dois isolados de PVY recombinantes. Um dos isolados apresentou-se muito semelhante ao isolado EU-PVY<sup>NTN</sup>, possuindo pontos de recombinações entre o EU-PVY<sup>N</sup> e o PVY<sup>O</sup>. Outro isolado, denominado 'HN2', apresentou características de recombinação entre o PVY<sup>O</sup>, EU-PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>N-Wi</sup>. O 'HN2' ainda reage ao sorotipo para PVY<sup>O</sup> e causa sintomas típicos de PVY<sup>N</sup> em tabaco e batata, características que também têm sido relacionadas ao variante PVY<sup>NTN-NW</sup>, da Síria (HU et al., 2009).

Em estudo realizado no norte da Tunísia, com 32 isolados de PVY, foi demonstrado que 25 deles apresentaram-se como PVY<sup>NTN</sup>. Esses resultados ressaltam a alta incidência de PVY<sup>NTN</sup> em todas as regiões analisadas e em todas as cultivares testadas, 'Nicola', 'Pamina', 'Atlas' e 'Spunta'. Os autores ainda mostraram que o variante PVY<sup>N-Wi</sup> nunca foi relatado em campos produtores de batata na Tunísia (DJILANI-KHOUADJA et al., 2010).

Análises das sequências da CP de 75 isolados de PVY sul-africanos mostraram que a grande maioria apresenta pontos de recombinação entre as estirpes PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>O</sup>, sendo, então, caracterizados como o variante PVY<sup>NTN</sup>. Três desses isolados foram muito semelhantes aos isolados PVY<sup>N</sup> de origem chinesa, demonstrando que os isolados sul-africanos não representam um

grupo monofilético, inferindo sobre a ocorrência de recombinação natural deste variante e da entrada de novos isolados via batata semente importada neste país (VISSER; BELLSTEDT, 2009).

### 2.3.3 PVY<sup>NTN</sup> e cultivar Ágata

Um dos principais impactos econômicos associados à introdução do PVY<sup>NTN</sup> foi a redução de área cultivada com a cv. Monalisa de 70% para menos de 25%, possivelmente devido à sua alta sensibilidade ao PVY<sup>NTN</sup>, o que torna os tubérculos dessa cultivar não comercializáveis (SOUZA-DIAS; SAWAZAKI, 2004). Logo, os bataticultores buscaram soluções rápidas para esse problema, passando, então, a plantar as cultivares Ágata, Asterix e Cupido que, mesmo sendo suscetíveis à infecção por PVY<sup>NTN</sup>, não mostram sintomas de anéis necróticos nos tubérculos, mesmo após inoculações experimentais (SAWAZAKI et al., 2009). Barker et al. (2009) ressaltam que infecções por PVY<sup>NTN</sup> nem sempre são acompanhadas do sintoma de anéis necróticos nos tubérculos. Esses autores propõem que variações de um tipo de sintoma para outro podem ser resultado de alterações nas sequências de nucleotídeos em vários genes, contribuindo para o fenótipo final.

Atualmente, a cv. Ágata é a mais plantada no Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA - ABBA, 2010), facilitando a disseminação do PVY<sup>NTN</sup> através do comércio de batata semente não indexada. Esta cultivar é considerada, pela ABBA, como resistente ao PVY, possivelmente devido a não ocorrência dos sintomas de anéis necróticos nos tubérculos. É importante ressaltar que esse tipo de resistência da cv. Ágata não é devido à presença de genes que induzem resistência extrema, ou imunidade, como é o caso do gene *Ry*. Dessa forma, em condições de campo, essa ausência de sintomas pode

variar de acordo com a incidência de inóculo e do vetor, além de ser influenciada também por fatores climáticos.

Salas, Lopes e Fereres (2004), estudando a resistência da cv. Ágata em relação à transmissão do PVY pelo vetor *M. persicae*, constataram que, quando se tratava do PVY<sup>O</sup>, essa cultivar foi considerada moderadamente resistente, com 57% das plantas infectadas. Já em relação ao PVY<sup>NTN</sup> e ao PVY<sup>N</sup>, ela foi considerada suscetível, com 89% e 85% de plantas infectadas, respectivamente.

Ramalho et al. (2010) verificaram que a cv. Ágata não apresentou sintomas foliares, mesmo em níveis elevados de concentração viral, embora tenha sido relatada queda na produção, sendo esta gradativa à medida que a concentração de PVY aumentou nos tubérculos. Outro agravante é o fato de se constituir uma fonte de inóculo silenciosa no campo, que pode comprometer o plantio de outras lavouras na mesma região.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. J.; ANTONTW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 150, n. 3, p. 459-479, Mar. 2005.
- ANDRADE, E. R.; FIGUEIRA, A. R. Degenerescência em seis cultivares de batata (*Solanum Tuberosum* L.) na região Sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 1, p. 9-15, 1991.
- ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria, 2010. 427 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA. Brasil: atuais variedades. **Revista Batata Show**, Itapetininga, ano 10, n. 28, p. 1, dez. 2010.
- ÁVILA, A. C. et al. Ocorrência de vírus em batata em sete estados do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 490-497, out./dez. 2009.
- ÁVILA, A. C.; MELO, P. E.; LEITE, L. R. O vírus Y da batata (Potato Vírus Y) e a batata-semente nacional: quem vencerá. **Revista Batata Show**, Itapetininga, v. 7, n. 17, p. 14-17, 2007.
- BANTTARI, E. E. et al. Management of disease caused by viruses and viruslike pathogens. In: ROUE, R. C. (Ed.). **Potato health management**. Saint Paul: APS, 1993. p. 127-133.
- BARKER, H. et al. Comparison of genome sequence of PVY isolates with biological properties. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 86, n. 3, p. 227-238, Mar. 2009.
- BECZNER, L. et al. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. **Potato Research**, Wageningen, v. 27, n. 3, p. 339-352, Sept. 1984.
- BLANCO-URGOITI, B. et al. Characterization of potato virus Y (PVY) isolates from seed potato batches: situation of the NTN, Wilga and Z isolates. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, n. 8, p. 811-819, Nov. 1998.
- \_\_\_\_\_. Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. **Journal of General Virology**, London, v. 79, pt. 8, p. 2037-2042, 1998.

BOITEAU, G. et al. The spread of PVY<sup>O</sup> in the new Brunswick potato field timing and vectors. **American Potato Journal**, Orono, v. 65, n. 11, p. 639-649, Nov. 1988.

BOKX, J. A. Biological properties. In: BOKX, J. A.; WANT, D. E. van der (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2<sup>nd</sup> ed. Wageningen: PUDOC, 1987. p. 58-82.

BOKX, J. A.; BUS, C. B. Potato leafroll. In: ZAAG, D. E. van der (Ed.). **Potato diseases: diseases, pests and defects**. Wageningen: NIVAA, 1996. p. 70-71.

BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. **Potato Virus Y**. Kew: Commonwealth Mycology Institute, 1981. (Descriptions of Plant Viruses, 242). Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

BOKX, J. A.; PIRON, P. G. M. Relative efficiency for a number of aphid species in the transmission of potato vírus Y<sup>N</sup> in the Netherlands. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 96, n. 4, p. 237-246, July 1990.

BOONHAM, N. et al. Biological and sequence comparisons of Potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 51, n. 1, p. 117-120, Feb. 2002.

BRUNT, A. A. et al. **Viruses of plants: descriptions and lists from the VIDE database**. Wallingford: CAB International, 1996. 1484 p.

CÂMARA, F. L. A.; CUPERTINO, F. P.; FILGUEIRA, F. A. R. Redução na produtividade de cultivares de batata causada por vírus. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 8-10, Nov. 1986.

CAMARGOS, V. N. **Caracterização patogênica e molecular de isolados do *Potato vírus Y (PVY)* causadores de anéis necróticos em tubérculos de batata**. 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CHIKH-ALI, M.; MAOKA, T.; NATSUAKI, K. T. A point mutation changes the serotype of Potato virus Y isolate: genomic determination of the serotype of PVY strains. **Virus Genes**, Norwell, v. 35, n. 2, p. 359-367, June 2007.

\_\_\_\_\_. Whole genome sequence and characterization of a novel isolates of PVY inducing tuber necrotic ringspot in potato and leaf mosaic in tobacco. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v. 156, n. 7/8, p. 413-418, Aug. 2007.

CHRZANOWSKA, M. Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. **Phytopathologia Polonica**, Poznan, v. 8, n. 20, p. 15-20, 1994.

\_\_\_\_\_. New isolates of the necrotic strain of potato vírus Y (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. **Potato Research**, Wageningen, v. 34, n. 2, p. 179-182, Apr. 1991.

CHUNG, B. Y. W. et al. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, Apr. 2008.

COCKERHAM, G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. **Heredity**, Washington, v. 25, p. 309-348, 1970.

\_\_\_\_\_. Some genetical aspects of resistance to potato viruses. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 32, p. 280-281, 1945.

DANIELS, J. Identificação sorológica de estirpes do vírus Y da batata do Sul do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 265-270, set. 2000.

\_\_\_\_\_. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata semente no Rio Grande do Sul. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 3/4, p. 269-270, 1995.

DANIELS, J. et al. Degenerescência de batata-semente básica após um ou dois períodos de cultivo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 510-513, set. 2002.

DJILANI-KHOUA, F. et al. Incidence of potato viruses and characterisation of Potato virus Y variability in late season planted potato crops in Northern Tunisia. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 4, p. 479-488, Apr. 2010.

ELLIS, P.; STACE-SMITH, R.; VILLEERS, G. Identification geographic distribution of serotypes of potato virus Y. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 5, p. 481-484, May 1997.

FAUQUET, C. M. et al. **Virus taxonomy**. San Diego: Elsevier Academic, 2005. 1259 p.

FIGUEIRA, A. R. Viroses da batata e suas implicações na produção da batata-semente do estado de Minas Gerais: histórico do problema e soluções. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 3/4, p. 269-270, 1995.

\_\_\_\_\_. Viroses da batata: situação atual e perspectivas futuras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 86-96, mar./abr. 1999.

FIGUEIRA, A. R. et al. New PVY necrotic strain is causing great losses in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 11, p. S85, Nov. 1996. Supplement. Abstracts.

\_\_\_\_\_. Presence of PVY<sup>N-Wi</sup> and NE-11 isolates of Potato virus Y (PVY) in Brazil. In: ANNUAL MEETING FROM POTATO ASSOCIATION OF AMERICA, 93., 2009, San Diego. **Proceedings...** San Diego: Elsevier, 2009. p. 62.

GALVINO-COSTA, S. B. F. et al. A novel type of Potato virus Y recombinant genome determined for the genetic strain PVY<sup>E</sup>. **Plant Pathology**, Honolulu, 2011. In press.

GÉBRÉ-SELASSIE, K. et al. Variabilité naturelle de souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France: caractérisation et classification en pathotypes. **Agronomie**, Paris, v. 5, p. 621-630, 1985.

GERALDINO, P. S. et al. Incidência de vírus em batata-semente no Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA-CIUFLA, 19.; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIC/CNPq, 19.; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIC/FAPEMIG, 19., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006. 1 CD-ROM.

GIBSON, R. W.; PAYNE, R. W.; KATINS, N. The transmission of potato virus Y by aphids of different vectoring abilities. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 113, n. 1, p. 35-43, Aug. 1988.



- GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 2, p. 363-378, Feb. 2002.
- GOODING, G. V.; TOLIN, S. A. Strains of potato virus Y affecting flue-cured tobacco in the southeastern United States. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, p. 200-204, 1973.
- HOLLINGS, M.; BRUNT, A. A. **Potyvirus group**. London: Commonwealth Mycology Institute, 1981. 7 p. (Description of Plant Viruses, 245).
- HU, X. et al. Molecular characterization and detection of recombinant isolates of potato virus Y from China. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 8, p. 1303-1312, Aug. 2009.
- HUTTON, E. M. The relationship between necrosis and resistance to virus Y in the potato: II., some genetical aspects. **Commonwealth Scientific and Industrial Research Australian**, Melbourne, v. 18, p. 219-224, 1945.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
**Levantamento sistemático de produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2010.  
Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 jan. 2012.
- JESUS, T. C. et al. Mudança na epidemiologia dos vírus que infectam a batata no Brasil na década 2000-2010. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. S144, 2010. Supplement.
- JONES, R. A. C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 117, n. 1, p. 93-105, 1990.
- JOHNSTON, G. R.; ROWBERRY, R. G. Yukon gold: a new yellowfleshed, medium-early high quality table and French-fry cultivar. **American Potato Journal**, Orono, v. 58, n. 5, p. 241-244, May 1981.

KARASEV, A. V. et al. Genetic diversity of the ordinary strain of *Potato virus Y* (PVY) and origin of recombinant PVY strains. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 7, p. 778-785, July 2011.

\_\_\_\_\_. Serological properties of ordinary and necrotic isolates of Potato virus Y: a case study of PVYN misidentification. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 87, n. 1, p. 1-9, 2010.

KERLAN, C. et al. Identification of the molecular make-up of the *Potato virus Y* strain PVYZ: genetic typing of PVYZ-NTN. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 9, p. 1052-1060, Sept. 2011.

\_\_\_\_\_. Variability of potato virus Y in potato crops in France. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, n. 11/12, p. 643-651, Nov./Dec. 1999.

KERLAN, C.; LE ROMANCER, M. **Potato tuber necrotic ringspot disease**. Vitoria: Gasteiz, 1992. 79 p.

KOSTIW, M. Transmission of potato virus Y by *Rhopalosiphum padi* L. **Potato Research**, Wageningen, v. 22, p. 237-238, 1979.

KUS, M. The epidemic of the tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVYNTN) and its effect on potato crops in Slovenia. In: EAPRVIROLOGY SECTION MEETING BLED, 9., 1995, San Diego. **Proceedings...** San Diego: Elsevier, 1995. p. 159-160.

LE ROMANCER, M.; KERLAN, C.; NEDELLEC, M. Biological characterisation of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 138-144, Mar. 1994.

LOEBENSTEIN, G. et al. **Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 488 p.

LORENZEN, J. H. et al. NE-11 represents a new strain variant class of potato virus Y. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 3, p. 517-525, Mar. 2008.

\_\_\_\_\_. Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. **Archives of Virology**, New York, v. 151, n. 6, p. 1055-1074, June 2006.

MCDONALD, J. G.; KRISTJANSSON, G. T. Properties of strains of potato virus YN in North America. **Plant Disease**, Quebec, v. 77, n. 1, p. 87-89, Jan. 1993.

MCDONALD, J. G.; SINGH, R. P. Host range, symptomology and serology of isolates of potato virus Y (PVY) that shared properties with the PVYN and PVYO strain groups. **American Potato Journal**, Orono, v. 73, n. 7, p. 309-315, July 1996.

MELLO, A. F. S. et al. Transmission efficiency of Potato virus Y strains PVY(o) and PVY(N-Wi) by five aphid species. **Plant Disease**, Quebec, v. 95, n. 10, p. 1279-1283, Oct. 2011.

MILNE, R. G. The economic impact of filamentous viruses. In: \_\_\_\_\_. **The plant viruses: the filamentous plant viruses**. New York: Plenum, 1988. p. 331-407.

MOURY, B. A new lineage sheds light on the evolutionary history of *Potato virus Y*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 1, p. 161-168, 2010.

NIE, X.; SINGH, R. P. Evolution on North American PVYNTN strains Tu 660 from local PVYN by mutation rather than recombination. **Virus Genes**, Norwell, v. 26, n. 1, p. 39-47, Feb. 2003.

NIE, X.; SINGH, R. P.; SINGH, M. Molecular and pathological characterization of N:O isolates of the Potato virus Y from Manitoba, Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 26, n. 4, p. 573-583, Aug. 2004.

OGAWA, T. et al. Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. **Virus Research**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 199-212, Feb. 2008.

ORLANDO, A.; SILBERSCHMIDT, K. M. Estudo sobre a transmissão de doenças de vírus de solanáceas “necrose das nervuras” por afídeos e algumas relações entre esse vírus e seu principal vetor. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 16, p. 133-152, 1945.

PICHE, L. M. et al. Diversity among Potato virus Y isolates obtained from potatoes in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 12, p. 1368-1375, Dec. 2004.

POWELL, G.; HARRISON, R.; SPILLER, N. J. Stylet activities and potato virus Y vector efficiencies by aphids *Brachycaudus helichrysi* and *Drepanosiphum platanoidis*. **Applied Entomology Experience**, Champaign, v. 62, n. 3, p. 293-300, Sept. 1992.

RABELO FILHO, F. A. C. **Caracterização de isolados do Potato vírus Y (PVY) de Minas Gerais e avaliação da disseminação do vírus e de resíduos de inseticidas em tubérculos de batata após o controle de vetores**. 2008. 115 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

RAMALHO, T. O. et al. Degenerescência causada pelo *Potato Virus Y* (PVY) em batata cv. Ágata. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. S148, 2010. Supplement.

REGENMORTEL, M. H. V. van et al. **Virus taxonomy**. San Diego: Academic, 2000. 16 p.

\_\_\_\_\_. **Virus taxonomy: genus *Potexvirus***. San Diego: Academic, 2000. 981 p.

ROMERO, A. et al. Characterization of typical pepper-isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. **Virus Research**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 71-80, Jan. 2001.

SALAS, F. J. S.; LOPES, J. R. S.; FERERES, A. Resistência de variedades comerciais de batata à transmissão do *Potato Y virus* pelo vetor *Myzus persicae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 167-173, abr./jun. 2004.

SAWAZAKI, E. H. et al. Potato Virus Y<sup>NTN</sup>: a coat and P1 protein sequences analysis of brazilian isolate. **Potato Research**, Wageningen, v. 52, n. 4, p. 379-392, Nov. 2009.

SCHUBERT, J. et al. Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 66-74, Feb. 2007.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. **The Potiviridae**. Wallingford: CAB International, 1994. 516 p.

SIGVALD, R. Aphid transmission and importance of some aphid species as vectors of potato virus Y<sup>0</sup> (PVY<sup>0</sup>) in Sweden. **Potato Research**, Wageningen, v. 30, n. 3, p. 267-283, Sept. 1987.

\_\_\_\_\_. The relative efficiency of some aphid species as vectors of potato virus Y<sup>0</sup> (PVY<sup>0</sup>). **Potato Research**, Wageningen, v. 27, n. 3, p. 285-290, Sept. 1984.

SILBERCHMIDT, K.; NOBREGA, N. R.; KRAMER, M. A. Identificação de vírus encontrados em campos de produção de tubérculo-semente de batatinha. **Agricultura**, Piracicaba, v. 21, p. 23-40, 1941.

SILVA, P. P. **Caracterização biológica e molecular do complexo Potato virus Y (PVY) infectando plantas de batata de distintas regiões produtoras do Brasil**. 2008. 161 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SINGH, R. P. et al. Discussion paper: the naming of Potato virus Y strains infecting potato. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

SOUZA-DIAS, J. A. C. Raças do vírus Y da batata (PVY) e a questão da variante NTN. **Batata Show**, Itapetininga, v. 1, n. 2, p. 16-21, 2001.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; SAWAZAKI, H. E. Monalisa and Atlantic potato cultivars have differential sensitivity to tuber symptom expression to PVYNTN as a function of their resistance to PVYO and PVYN. **American Journal Potato Research**, Orono, v. 81, n. 1, p. 55-56, Feb. 2004.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; TRISTÃO, J. F. Rise of PVY incidence in seed potato regions of São Paulo State (Brazil) associated with the introduction of Atlantic potatoes. **American Potato Journal**, Orono, v. 74, p. 469-473, 1997.

STEINBACH, P.; HAMANN, U. Symptome und Ursach einer wenig bekannten Ringnerkrose der Kartoffelkanolle. **Archiv fur Phutopathologie und Pflanzenschutz**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 223-232, 1989.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 74, n. 1/2, p. 157-175, Apr. 2001.

VECHI, C.; HIRANO, E. Situação da batata-semente no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 1, p. 55-58, 1984.

VERBEEK, M. et al. Determination of aphid transmission efficiencies for N, NTN and Wilga strains of *Potato virus Y*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 156, n. 1, p. 39-49, Mar. 2009.

VISSER, J. C.; BELLSTEDT, D. U. An assessment of molecular variability and recombination patterns in South African isolates of Potato virus Y. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 12, p. 1891-1900, Oct. 2009.

WEIDEMANN, H. L. Importance and control of potato virus Y<sup>N</sup> (PVY<sup>N</sup>) in seed potato production. **Potato Research**, Wageningen, v. 31, n. 1, p. 85-94, 1988.

WEIDEMANN, H. L.; MAISS, E. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVYNTN) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Berne, v. 103, n. 4, p. 337-345, Aug. 1996.

WEILGUNY, H.; SINGH, R. P. Separation of Slovenian isolates of PVYNTN from the North American isolates PVY<sup>N</sup> by a 3-primer PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 57-68, Feb. 1998.

XIANZOHOU, N.; SINGH, R. P. Specific differentiation of recombinant PVY(N:O) and PVY (NTN) isolates by multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 69-77, Apr. 2003.

## CAPÍTULO 2

### CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Potato virus Y* (PVY) DETECTADOS EM MINAS GERAIS

#### RESUMO

O *Potato virus Y* (PVY) tem seu genoma composto por um RNA de fita simples, sentido positivo, sendo um dos vírus mais importantes para a cultura da batata, no Brasil e no mundo. Devido à sua variabilidade genética, além dos três grupos de estirpes descritos inicialmente (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup> e PVY<sup>N</sup>), novas variantes genéticas têm sido descritos com frequência, como, por exemplo, o PVY<sup>E</sup> e o PVY<sup>Z</sup>. A identificação desses isolados é de grande importância para a tomada de medidas de controle no campo. Neste trabalho, foram coletados 26 isolados em diferentes localidades do estado de Minas Gerais e esses foram inoculados mecanicamente em plantas de fumo Turkish NN e nas cultivares de batata Desiree, que possui o gene *Ny*, Maris Bard, que carrega os genes *Ny*, *Nc* e *Nz* e King Edward, portadora do gene *Nc*. Em seguida, foram realizados os testes sorológicos DAS-ELISA e TAS-ELISA, com anticorpos monoclonais específicos para cada estirpe; RT-PCR Multiplex e RT-PCR, com o par de *primers* específicos para PVY<sup>E</sup>. Observou-se que a combinação dos resultados obtidos nos métodos biológicos, sorológicos e moleculares foi necessária para a identificação conclusiva dos isolados dentro de cada grupo de estirpes e seus variantes genéticos. Apenas um isolado, o DMO-AG-1, foi classificado como pertence ao patotipo PVY<sup>O</sup>, pois provocou reação de HR nas cultivares Maris Bard e Desiree, reagiu com o anticorpo monoclonal para essa estirpe e apresentou o padrão de bandas esperado no RT-PCR. Outro isolado, o MF-AG-52, apresentou comportamento atípico, mostrando reação positiva com o anticorpo monoclonal para PVY<sup>O</sup>, enquanto o padrão de bandas no RT-PCR foi para PVY<sup>NTN</sup>. Além disso, apresentou amplificação de bandas quando foi empregado o par *primers* específicos para PVY<sup>E</sup>. Isso indica que, provavelmente, esse isolado tem uma variabilidade genômica peculiar, que merece ser investigada. Entre os demais isolados, sete foram classificados como PVY<sup>N-wi</sup>, dezoito como PVY<sup>NTN</sup> e nenhuma estirpe PVY<sup>N</sup> foi encontrada. Os resultados apontam para uma predominância de isolados PVY<sup>NTN</sup>, seguidos pelo PVY<sup>N-wi</sup>, nos campos produtores de batata de Minas Gerais.

Palavras-chave: *Potato virus Y* (PVY), batata (*Solanum tuberosum* L.), classificação, Minas Gerais.

## ABSTRACT

The Potato virus Y (PVY) has a positive sense RNA single tape genome. It is one of the most important virus to potato crop in Brazil and worldwide. Due to its genetic variability, new genetic variants have been described as the PVY<sup>E</sup> and the PVY<sup>Z</sup>, in addition to the three groups of strains originally described (PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>O</sup>). The identification of these strains is of great importance for adopting control measures in the field. So, it was collected 26 strains in different locations in Minas Gerais, Brazil. The strains were mechanically inoculated in tobacco plants Turkish NN and potatoes cultivars Desiree, which owns the gene *Ny*, Maris Bard, which carries the genes *Ny*, *Nc* and *Nz* and King Edward, *Nc* gene carrier. From symptomatic leaves were conducted the serological tests DAS-ELISA and TAS-ELISA with specific monoclonal antibodies for each strain and Multiplex RT-PCR and RT-PCR with specific *primers* for PVY<sup>E</sup>. The combination of the results obtained with serological, molecular and biological methods was required to conclusively identify isolates within each group of strains and their genetic variants. Only the DMO-AG-1 strain was classified as a part of the pathotype PVY<sup>O</sup>, once it caused hypersensitive reaction (HR) Maris Bard and Desiree potato cultivars, reacted with the monoclonal antibody and presented the expected bands in RT-PCR. The MF-AG-52 strain exhibited atypical behavior, showing positive reaction with the monoclonal antibody to PVY<sup>O</sup>, while the RT-PCR bands pattern was similar to PVY<sup>NTN</sup>. In addition, this isolate presented band amplification when with the specific primers pair for PVY<sup>E</sup>, what probably indicates that this isolate has a peculiar genomic variability that needs to be investigated. Among the others isolates, seven were classified as PVY<sup>N-Wi</sup>, eighteen as PVY<sup>NTN</sup> and none PVY<sup>N</sup> strain was found. The results point to a predominance of PVY<sup>NTN</sup> isolates followed by PVY<sup>N-Wi</sup> strains in potato fields of Minas Gerais state, Brazil.

Keywords: *Potato virus Y* (PVY). Potato (*Solanum tuberosum* L.). Classification. Minas Gerais.



## 1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma importante fonte de nutrientes na alimentação humana em todo o mundo. No Brasil, essa cultura ocupa, aproximadamente, 140.000 hectares de área (ANUÁRIO..., 2011). Atualmente, a China é o maior produtor, seguido por Rússia e Índia, enquanto, no ranking mundial, o Brasil está em 21º lugar.

A cultura da batata pode ser afetada por vários patógenos, dentre os quais o *Potato Virus Y* (PVY) tem sido um dos mais importantes em diversos lugares do mundo (VALKONEN, 2007). Este vírus é o membro tipo do gênero *Potyvirus* (Família *Potyviridae*). Ele tem um genoma composto por uma fita simples de RNA positivo, com aproximadamente 9,7 Kb, que codifica uma única poliproteína que depois é clivada, originando dez proteínas funcionais (P1, HC-PRO, P3, 6 K1, CI, 6 K2, VPg, NIa-Pro, NIb, e CP).

A transmissão do PVY se dá, principalmente, através do vetor *Myzus persicae* e o sintoma característico em plantas de batata é denominado mosaico, devido às diferentes tonalidades de verde apresentadas pelas folhas das plantas infectadas. Até pouco tempo atrás, eram reconhecidas apenas três estirpes do PVY, que são o PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>C</sup>, porém, recentemente, Singh et al. (2008) propuseram mais duas estirpes, denominadas PVY<sup>Z</sup> e PVY<sup>E</sup>. A diferenciação das estirpes pode ser feita por meio da distinção fenotípica em diferentes cultivares de batata que possuem genes específicos de resistência (*Ny*, *Nc* e *Nz*).

O conceito genético de patótipo-gene de resistência, em pimentão, foi recentemente elucidado. Descobriu-se que a interação responsável por esse fator está presente na região da proteína VPg, presente no isolado de PVY, que infecta o pimentão e o gene de resistência (*eIF4E*), presente nessa planta (AYME et al., 2007; MOURY et al., 2004). Acredita-se que a mesma relação

pode estar presente entre isolados de PVY e os genes de HR em diferentes cultivares de batata (SINGH et al., 2008). A cultivar King Edward, quando inoculada com a estirpe PVY<sup>C</sup>, apresenta sintoma de HR, pois ela tem o gene *Nc*; a ‘Pentland Crown’ ou a ‘Desirre’, que carregam o gene *NY*, apresentam HR na presença do PVY<sup>O</sup>; a ‘Pentland Ivory’ ou ‘Maris Bard’, portadoras dos genes *Nc*, *NY* e *Nz* apresentam reação de HR, quando inoculadas com as estirpes PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>Z</sup>, enquanto o PVY<sup>N</sup> não causa sintoma de HR em nenhuma destas cultivares, mas origina necrose internerval em plantas de fumo e, por fim, a estirpe PVY<sup>E</sup> não induz HR em nenhuma das cultivares de batata e nem em plantas de fumo (GALVINO-COSTA et al., 2011; KARASEV et al., 2011; KERLAN et al., 2011; SINGH et al., 2008).

Visando caracterizar os variantes genéticos do PVY que têm sido detectados nos campos produtores de Minas Gerais, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o comportamento biológico de 26 isolados desse vírus, com base nos sintomas induzidos em plantas de fumo e nas cultivares indicadoras de batata King Edward, Desiree e Maris Bard, fez-se a sua classificação sorológica utilizando-se anticorpos policlonais e monoclonais em testes sorológicos DAS e TAS-ELISA e também se identificaram as estirpes e variantes por meio da técnica RT-PCR multiplex.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV-MG), em casa de vegetação e no Laboratório de Virologia Molecular, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 2.2 Obtenção e armazenamento dos isolados

Foram estudados 26 isolados de PVY, sendo 18 deles obtidos de tubérculos ou folhas de campos de produção de batatas, encaminhados ao Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV-MG), 7 foram coletados diretamente de campos de produção de batata e 1 foi obtido da coleção de vírus do Laboratório de Virologia da UFLA (Tabela 1).

Todas as amostras foram testadas por DAS-ELISA, empregando-se anticorpos monoclonais da Bioreba para o vírus X (*Potato virus X* - PVX), vírus S (*Potato virus S*- PVS), vírus Y (*Potato virus Y*) e vírus do enrolamento da folha (*Potato Leafroll Virus*- PLRV), a fim de identificar possíveis infecções mistas presentes nas folhas ou nos tubérculos coletados.

Tubérculos que apresentaram infecção apenas pelo PVY e em alta concentração foram selecionados e plantados em vasos de 5 kg, com terra, areia e esterco, na proporção de 2:1:1, e as plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação dos sintomas. No caso dos isolados coletados em folhas, estas também foram inicialmente submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA para os vírus mencionados e, em seguida, o extrato foliar obtido da maceração em tampão fosfato 0,01M (pH 7), contendo sulfato de sódio na

mesma molaridade, foi inoculado mecanicamente em plantas de fumo cv. Turkish NN. Parte do tecido vegetal das plantas infectadas foi dessecada e guardada, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , parte mantida a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e os tubérculos armazenados em câmara fria, para utilização como fonte de inóculo, durante o experimento.

A origem e a denominação dos isolados, bem como os sintomas induzidos na cultivar em que eles foram originalmente coletados, estão descritos na Tabela 1. Os isolados coletados em 2010/2011 foram adicionados à coleção de vírus do Laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFLA, de forma que folhas das plantas de fumo infectadas com cada isolado foram armazenadas sob a forma dessecada, em congelador, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e/ou na forma de tecidos frescos congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para serem reinoculados e multiplicados sempre que necessário.

Tabela 1 Denominação e origem dos isolados de PVY estudados

DENOMINAÇÃO	LOCAL DE ORIGEM DOS ISOLADOS	CULTIVAR	LOCAL DE COLETA DOS ISOLADOS
AD-AG-1	ANDRADAS	Ágata	CIV-MG
AD-AG-2	ANDRADAS	Ágata	CIV-MG
AD-AG-3	ANDRADAS	Ágata	CIV-MG
MF-AG-42	MARIA DA FÉ	Ágata	CIV-MG
MF-AG-52	MARIA DA FÉ	Ágata	CIV-MG
MF-AG-103	MARIA DA FÉ	Ágata	CIV-MG
MF-AG-105	MARIA DA FÉ	Ágata	CIV-MG
SJ-CHI-1	SANTA JULIANA	Chipie	CIV-MG
SJ-CHI-2	SANTA JULIANA	Chipie	CIV-MG
PA-EP	POUSO ALEGRE	Excelente pouso	CIV-MG
OF-CHIP	OURO FINO	Chipie	CIV-MG
DMO-AG-1	DELFIN MOREIRA	Ágata	CIV-MG
DMO-AG-2	DELFIN MOREIRA	Ágata	CIV-MG
IND-AG-1	INDIANOPOLIS	Ágata	CIV-MG
IND-AG-2	INDIANOPOLIS	Ágata	CIV-MG
SGOT-AR	SÃO GOTARDO	Arrow	CIV-MG
SS-AG-1	SERRA DO SALITRE	Ágata	CIV-MG
SS-AG-2	SERRA DO SALITRE	Ágata	CIV-MG
PER-AG-50	PERDIZES	Ágata	CAMPO*
PER-AG-60	PERDIZES	Ágata	CAMPO*
SA-CL	SENADOR AMARAL	Clone	CAMPO*
CA-AG-1	CAMPOS ALTOS	Ágata	CAMPO*
CA-AG-2	CAMPOS ALTOS	Ágata	CAMPO*
SAC-AG	SACRAMENTO	Ágata	CAMPO*
MV-CL	MONTE VERDE	Clone	CAMPO*
SAT-AG	SACRAMENTO	Ágata	COLEÇÃO**

\* Campo de produção de batata consumo

\*\*Coleção de vírus do Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras

### 2.3 Inoculação mecânica em plantas indicadoras

Para a caracterização biológica dos 26 isolados estudados, foram realizadas inoculações mecânicas em três cultivares de batatas indicadoras portadoras de “background” genético conhecido e que expressam diferentes sintomas na presença das diferentes estirpes do *Potato virus Y* (PVY). As

cultivares indicadoras usadas foram: ‘King Edward’ (expressa o gene de hipersensibilidade *Nc*), ‘Desiree’ (expressa o gene *Ny*) e Maris Bard’ (expressa o gene *Ny*, *Nc* e *Nz*) (SINGH et al., 2008), conforme apresentado na Tabela 2. A caracterização biológica foi feita utilizando-se as cultivares indicadoras citadas anteriormente, em duas épocas diferentes do ano, sendo a primeira no período de junho a agosto de 2011 e a segunda, de dezembro a fevereiro, 2011/2012. Quatro plantas de cada cultivar foram utilizadas em cada repetição do experimento e estas foram inoculadas mecanicamente, no estádio de quatro a seis pares de folhas e mantidas em casa de vegetação para avaliação dos sintomas. Os sintomas foram avaliados visualmente até seis/sete semanas após a inoculação das plantas.

Tabela 2 Reação esperada das cultivares indicadoras de batata inoculadas e das plantas de fumo, com seus respectivos genes de resistência elicitados pelas diferentes estirpes/variantes de *Potato virus Y* (PVY)

CULTIVARES	PVY <sup>C</sup>	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>Z</sup>	PVY <sup>E</sup>	GENE DE RESISTÊNCIA
King Edward	HR	M	M	M	M	<i>Nc:ny:nz</i>
Desiree	M	HR	M	M	M	<i>nc:Ny:nz</i>
Maris Bard	HR	HR	M	HR	M	<i>Nc:Ny:Nz</i>
Tabaco	M	M	NV	M	M	-

HR: hipersensibilidade; NV: necrose nas nervuras; M: mosaico

Fonte: adaptada de Singh et al. (2008)

#### 2.4 Caracterização sorológica dos isolados

Esse processo foi realizado no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV/MG, DFP/UFLA), empregando-se o método TAS-ELISA, descrito por Karasev et al. (2010). Foram utilizados os antissoros policlonais UID8 e G500 para a detecção de todas as estirpes do PVY, combinados com os seguintes anticorpos monoclonais: MAb2, que reconhece o PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N:O</sup> e a estirpe PVY<sup>C</sup> (MCDONALD; KRISTJANSSON, 1993); 1F5, para as estirpes

PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O/O5</sup> e PVY<sup>NTN</sup> (ELLIS et al., 1996; KARASEV et al., 2010); SASA-N, que é positivo para PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup> (Science and Advice for Scottish Agriculture) e SASA-O, para PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N:O</sup> e PVY<sup>C</sup> (Science and Advice for Scottish Agriculture). Os isolados PVY<sup>O</sup>-ANT (PVY<sup>O</sup>), MFE-AG (PVY<sup>N:O/W</sup>), ARA-MO (PVY<sup>NTN</sup>) e MAF-VOY (PVY<sup>N:O/O5</sup>) foram utilizados como controles positivos oriundos da coleção de vírus do Laboratório de Virologia Molecular da UFPA, representando cada estirpe/sorotipo padrão.

## 2.5 Identificação das estirpes/variantes via RT-PCR

A extração do RNA viral foi realizada segundo o protocolo Dellaporta I. Folhas de fumo jovens, com sintomas característicos de PVY, foram maceradas em microtubos, na presença de nitrogênio líquido e ao pó obtido foi adicionado o tampão de extração Dellaporta I (100 mM Tris, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, B-mercaptoetanol e água ultrapura), na proporção de 1 g para 0,1 mL. Posteriormente, foram adicionados aos microtubos SDS 10% e os microtubos foram incubados em banho-maria, à 65 °C, por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado acetato de potássio 5M e centrifugou-se por 10 minutos, a 9.500 rpm, à temperatura ambiente ou a 4 °C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para outro microtubo e a ela foi adicionada metade do seu volume de isopropanol. Essa mistura foi homogenizada cuidadosamente por inversão e mantida no gelo, por cinco minutos, para precipitação do RNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados, a 12.000 rpm, por 20 minutos, à temperatura ambiente ou a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 800 µl de etanol 70%, gelado e, em seguida, os tubos foram centrifugados novamente, por 10 minutos, a 10 °C, a 9.500 rpm. Após a secagem do precipitado a vácuo, o RNA foi ressuscitado em 80 µl de água

ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%.

Para a diferenciação das estirpes/variantes genéticos do PVY, utilizou-se a reação de RT-PCR Multiplex, descrita por Lorenzen et al. (2006), na qual foi empregado um conjunto de oito *primers*, discriminados na Tabela 3. Em adição, foi utilizado o *primer* NE(11) 9026R (LORENZEN et al., 2008), juntamente com o *primer* AGA-8032F, desenhado por Galvino-Costa et al. (2011), que permite a diferenciação entre dois isolados de PVY<sup>E</sup> recentemente caracterizados no Brasil.

O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com *gel red nucleic acid gel stain* (Biotium).

Tabela 3 Combinação de *primers* utilizados na técnica RT-PCR Multiplex e tamanho do fragmento genômico esperado como produto da PCR para cada um dos variantes genéticos do *Potato vius* Y (PVY)

Combinação de <i>primers</i>	Tamanho do fragmento a ser amplificado	Variante detectado
n2258 + o2439c	181 bp	PVY <sup>NTN</sup> , PVY <sup>N-Wi</sup>
o2172 + o2439c	267 bp	PVY <sup>O</sup>
n2258 + n2650c	398 bp	PVY <sup>N</sup>
n5707 + A6032m	328 bp	PVY <sup>N</sup> , PVY <sup>NA-N/NTN</sup>
S5585m + A6032m	452 bp	PVY <sup>NTN</sup>
S5585m + o6266c	689 bp	PVY <sup>N-Wi</sup> , PVY <sup>O</sup>



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização biológica baseada nos sintomas induzidos em plantas indicadoras

A sintomatologia induzida pelos diferentes isolados do *Potato Virus Y* (PVY), nas cultivares indicadoras de batata, apresentou o mesmo padrão sintomatológico, nas duas épocas em que foram realizados os experimentos, junho a agosto de 2011 e dezembro a fevereiro de 2011/2012.

Os sintomas induzidos pelas diferentes estirpes/isolados de PVY inoculados nas cultivares indicadoras utilizadas estão discriminados na Tabela 4. De modo geral, a cv. King Edward apresentou mosaico e clareamento internerval, com diferentes intensidades, para todos os isolados. Em alguns casos, pequenos pontos necróticos foram observados nas folhas apicais das plantas cv. Maris Bard, em adição aos sintomas de mosaico, porém, sem relação com a estirpe/isolado.

O MO-AG-1 foi o único isolado que induziu necrose sistêmica nas cultivares Desiree e Maris Bard e os primeiros sinais de necrose apareceram por volta de uma semana após inoculação. Inicialmente, observou-se o clareamento das nervuras, que rapidamente se transformou em necrose. O mesmo foi observado para os anéis cloróticos, com halos amarelados, que se expandiram rapidamente e se tornaram grandes lesões necróticas, coalescendo e cobrindo todo o folíolo, causando o sintoma conhecido como “leaf drop” (Figura 1). De acordo com a classificação proposta por Singh et al. (2008), essa reação de HR é típica de isolados que pertencem ao patotipo PVY<sup>0</sup>.

Todos os demais isolados induziram sintomas de mosaico nas três cultivares indicadoras de batata, os quais surgiram cerca de dez dias após a inoculação. Com exceção do MO-AG-1, nenhum dos isolados testados induziu

reação de HR nas três cultivares indicadoras de batata inoculadas, sugerindo que eles pertenceriam ao patotipo PVY<sup>N</sup> ou ao patotipo PVY<sup>E</sup>, pois a cultivar King Edward reage com HR ao PVY<sup>C</sup> e a Maris Bard com HR ao PVY<sup>Z</sup>.

Conforme era esperado, os tubérculos produzidos pelas três cultivares indicadoras de batata não apresentaram sintoma aparente de anel necrótico (PTNRD), quando as plantas foram infectadas com PVY<sup>NTN</sup>.

Tabela 4 Sintomatologia observada nas três cultivares indicadoras e nas plantas de fumo inoculadas com os isolados de PVY estudados, nas duas épocas do experimento, junho a agosto 2011 e dezembro a fevereiro 2011/2012

ISOLADOS DE PVY	SINTOMAS APRESENTADOS PELAS PLANTAS INDICADORAS			
	Batata cv. Desiree	Batata cv. King Edward	Batata cv. Maris Bard	Fumo cv. Turkshi NN
AD-AG-1	M	M	M	PN, M
AD-AG-2	M	M	M	PN, M
AD-AG-3	M	M	M	PN, NN, M
CA-AG-1	M	M	M	PN, NN, M, E
CA-AG-2	M	M	M	PN, NN, M, E
DMO-AG-1	M, LNL, LNS, LD	M	M, LNL, LNS, LD	M
DMO-AG-2	M	M	M	PN, NN, M, E
IND-AG -1	M	M	M	PN, NN, M, E
IND-AG-2	M	M	M	PN, NN, M, E
MF-AG-42	M	M	M	PN, NN, M, E
MF-AG-52	M	M	M	PN, NN, M
MF-AG-103	M	M	M	PN, NN, M
MF-AG-105	M	M	M	PN, NN, M, E
MV-CL	M	M	M	PN, NN, M, E
OF-CHIP	M	M	M	PN, NN, M, E
PA-EP	M	M	M	M
PER-AG-50	M	M	M	PN, M
PER-AG-60	M	M	M	PN, NN, M, E
SA-CL	M	M	M	PN, NN, M, E
SAC-AG	M	M	M	PN, NN, M, E
SAT-AG	M	M	M	PN, M
SGOT-AR	M	M	M	PN, NN, M, E
SJ-CHI-1	M	M	M	M
SJ-CHI-2	M	M	M	PN, M
SS-AG-1	M	M	M	PN, M
SS-AG-2	M	M	M	PN, NN, M, E

M: mosaico; LNL: lesão necrótica local; LNS: lesão necrótica sistêmica; LD: queda das folhas; E: encarquilhamento

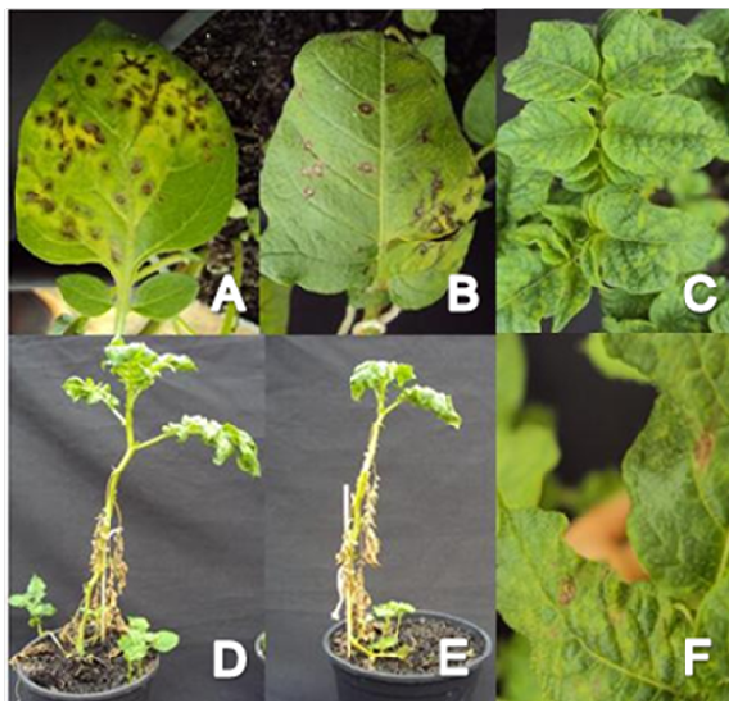


Figura 1 Padrão de sintomas induzidos nas cultivares de batata pelos isolados do PVY. A e B: lesões locais necróticas; D e E: necrose seguida de queda nas folhas (“leaf drop”) das cultivares Desiree e Maris Bard, respectivamente; C: mosaico e encarquilhamento; F: mosaico, embolhamento e pontos necróticos nas folhas apicais da cv. Maris Bard

A translocação sistêmica do vírus para a parte superior das plantas, assim como para os tubérculos, foi comprovada pelo teste sorológico DAS-ELISA.

Os sintomas induzidos nas plantas de fumo começaram a surgir por volta dos 3 aos 7 dias após a inoculação e se caracterizaram por mosaico, pontuações necróticas, necrose nas nervuras e encarquilhamento (Figura 2, Tabela 4), variando com o isolado.

Três isolados, PA-EP, SJ-CHI-1 e DMO-AG-1, não induziram sintoma de necrose nas plantas de fumo, o que seria típico de plantas pertencentes aos patótipos PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>E</sup> ou PVY<sup>Z</sup>, na classificação de Singh et al. (2008). Entretanto, aliado aos resultados obtidos com as cultivares de batata indicadoras, pode-se inferir que o isolado DMO-AG-1 pertence ao grupo de estirpes PVY<sup>O</sup> e a identidade mais provável dos outros dois seria a PVY<sup>E</sup>.

Os 23 isolados restantes induziram sintoma de necrose, que variou de pontos necróticos a necrose nas nervuras, indicando que eles pertencem ao patótipo PVY<sup>N</sup> (SINGH et al., 2008) ou ao variante PVY<sup>N-Wi</sup> que, apesar de ser classificado como pertencente ao grupo sorológico O, é capaz de induzir sintoma leve de necrose nas plantas de fumo (LE ROMANCER et al., 1994).

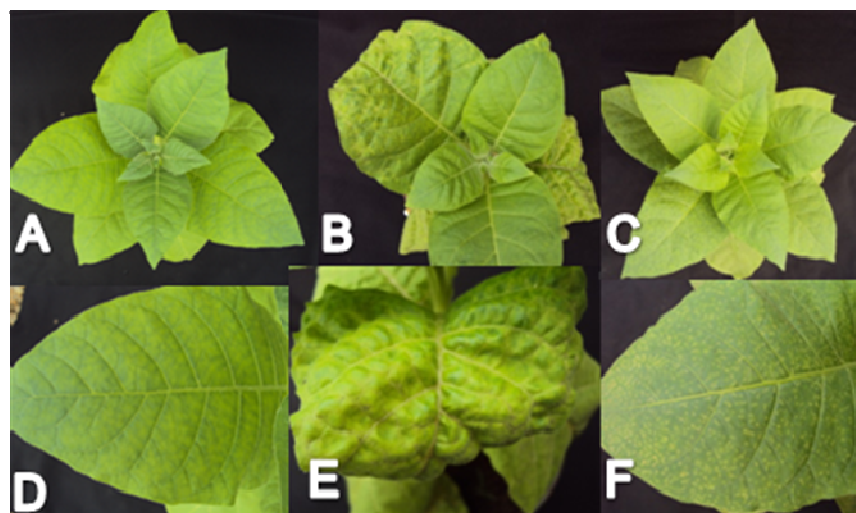


Figura 2 Sintomas dos isolados de PVY em plantas de fumo. A e D: mosaico; B e E: mosaico, necrose nas nervuras, pontos necróticos e encarquilhamento; C e F: mosaico e pontos necróticos

### 3.2 Caracterização sorológica e molecular

Os resultados dos testes sorológicos e de RT-PCR estão discriminados na Figura 3 e na Tabela 5. Todos os isolados foram reconhecidos pelo antissoro UID8 (policlonal), no teste sorológico TAS-ELISA, mostrando que a inoculação mecânica realizada foi eficiente em 100% das plantas de fumo inoculadas. No teste sorológico com os 26 isolados estudados, utilizando-se os anticorpos monoclonais para caracterização do sorotipo, nove isolados (AD-AG-1, AD-AG-2, AD-AG3, DMO-AG-1, MF-AG-52, PA-EP, PER-AG-50, PER-AG-60 e SJ-CHI-1) foram positivos para os anticorpos monoclonais específicos para PVY<sup>O</sup> (MAb2 e SASA-O) e os demais foram positivos para os anticorpos monoclonais específicos para PVY<sup>N</sup> (1F5 e SASA-N).

Quando foram empregados os *primers* específicos para cada estirpe/isolado, no RT-PCR multiplex (LORENZEN et al., 2006), sete deles (AD-AG-1, AD-AG-2, AD-AG3, PA-EP, PER-AG-50, PER-AG-60 e SJ-CHI-1) mostraram as duas bandas características de 181 pb e 689 pb de PVY<sup>N-Wi</sup>, um (DMO-AG-1) mostrou as bandas de 267 pb e 689 pb de PVY<sup>O</sup> e dezoito mostraram as bandas de 181 pb e 452 pb de PVY<sup>NTN</sup>, conforme discriminado nas Tabelas 3 e 5 e na Figura 3. Nenhuma infecção mista foi detectada nas plantas infectadas com os isolados estudados.

Esses resultados mostraram uma predominância do PVY<sup>NTN</sup> em Minas Gerais, pois aproximadamente 70% dos isolados coletados no ano de 2011 foram classificados como pertencentes a esse variante. A segunda estirpe recombinante mais frequente foi a PVY<sup>N-Wi</sup>, representando, aproximadamente, 27% dos isolados estudados nesse trabalho. A estirpe comum do PVY praticamente não tem sido encontrada nos campos produtores de batata de Minas Gerais, fato esse confirmado pela presença de apenas 1 isolado dessa estirpe, dentre os 26 coletados nas diferentes regiões do estado.

Comparando os resultados biológico, sorológico e molecular, observa-se que os isolados PA-EP e SJ-CHI-1 não induziram necrose em plantas de fumo, mas foram caracterizados como PVY<sup>N-Wi</sup>, o que não era esperado, pois os isolados Wilga induzem necrose, mesmo que seja mais leve, em plantas de fumo. O MF-AG-52 apresentou um padrão sorológico diferente, pois reagiu com o antissoro monoclonal para PVY<sup>O</sup>, mas foi caracterizado como PVY<sup>NTN</sup> no RT-PCR. Por outro lado, quando se empregou o par de *primers* utilizados por Galvino-Costa et al. (2011) para amplificação de um isolado brasileiro diferente, denominado PVY-AGA, foi obtida uma banda de 995 pb (Figura 3), indicando que esse isolado deve ser um recombinante diferente, que merece ser estudado.

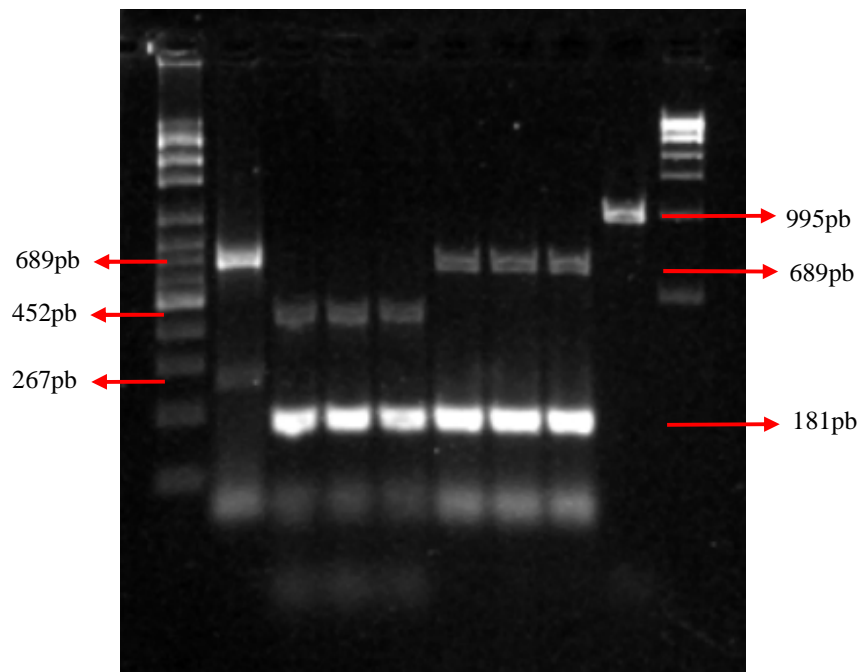


Figura 3 Análise eletroforética da RT-PCR Multiplex e RT-PCR com os primers AGA-8032F e NE-9026R. 1: Marcador (100pb); 2: PVY<sup>O</sup>; 3, 4, 5: padrão de bandas apresentados pelos 18 isolados PVY<sup>NTN</sup>; 6, 7, 8: padrão de bandas apresentados pelos 7 isolados PVY<sup>N-Wi</sup>; 9: PVY<sup>E</sup>; 10 Marcador (1 K pb)



Tabela 5 Teste sorológico TAS-ELISA e RT-PCR Multiplex, utilizados para caracterizar os isolados de PVY estudados

<b>ISOLADO</b>	<b>TAS-ELISA (sorotipo)</b>	<b>RT-PCR MULTIPLEX</b>
AD-AG-1	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>
AD-AG-2	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>
AD-AG-3	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>
PA-EP	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>
PER-AG-50	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>
PER-AG-60	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>
SJ-CHI-1	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>
DMO-AG-1	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>O</sup>
CA-AG-1	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
CA-AG-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
DMO-AG-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
IND-AG-1	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
IND-AG-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
MF-AG-42	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
MF-AG-52	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
MF-AG-103	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
MF-AG-105	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
MV-CL	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
OF-CHIP	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
SA-CL	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
SAC-AG	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
SAT-AG	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
SGOT-AR	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
SJ-CHI-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
SS-AG-1	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>
SS-AG-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>

#### 4 DISCUSSÃO

Os sintomas induzidos pelos diferentes isolados nas plantas indicadoras foram variáveis, entretanto, forneceram uma boa indicação da sua etiologia. Os sintomas apresentados pelas plantas de batata discriminaram corretamente entre as estirpes PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>C</sup>, mas não foram capazes de discriminar a PVY<sup>N</sup> da PVY<sup>E</sup>, precisando, para isso, dos sintomas apresentados pelas plantas de fumo.

Quando o PVY começou a ser estudado, apenas três grupos distintos de estirpes foram descritas, com base na sintomatologia induzida em fumo e batata: o PVY<sup>O</sup>, que causa mosaico sistêmico em folhas de fumo; o PVY<sup>N</sup>, que provoca sintoma de necrose nas nervuras de fumo e o PVY<sup>C</sup>, responsável pelo sintoma do tipo “Stipple Streak” em algumas cultivares de batata que possuem o gene Nc (BOKX; HUTTINGA, 1981). Devido à grande variabilidade genética que o PVY vem apresentando, houve a necessidade de se adotar novas indicadoras, capazes de discriminar variantes das estirpes comum e necrótica, resultantes da recombinação entre elas, como PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>N-Wi</sup> e PVY<sup>E</sup>, dentre outros (SINGH et al., 2008).

Neste trabalho, o isolado DMO-AG-1, coletado no município de Delfim Moreira, comportou-se como um típico PVY<sup>O</sup>, pois induziu reação de HR em plantas de batata que possuem o gene Ny (cv. Desiree) e os genes Nc:Ny:Nz (cv. Maris Bard), causou mosaico nas plantas de fumo e mostrou o padrão de bandas esperado na RT-PCR. Entretanto, ficou evidente a dificuldade de se classificar isolados de PVY com base nos sintomas, quando foram analisados os isolados PA-EP e SJ-CHI-1, que não induziram a necrose esperada nas plantas de fumo (CHRZANOWSKA, 1991). Portanto, seria esperado que fossem semelhantes aos PVY<sup>E</sup> descritos por Singh et al. (2008).

Porém, na RT-PCR Multiplex, eles apresentaram o padrão de PVY<sup>N-Wi</sup>, ao passo que o PNY<sup>E</sup> apresenta o padrão de PNY<sup>NTN</sup>.

Isolados do variante Wilga, que não induzem necrose em plantas de fumo, denominados PVY<sup>N-Wi-minus</sup>, já foram relatados na América do Norte, por Gray et al. (2010). Esses isolados possuem uma recombinação na proteína P1, que contém uma parte no terminal 5', semelhante ao PVY<sup>O</sup> e a outra parte no terminal 3', semelhante ao PVY<sup>N</sup>, enquanto nos isolados PVY<sup>N-Wi</sup>, que induzem sintoma de necrose no fumo, todo o gene da proteína P1 é proveniente da estirpe PVY<sup>N</sup>.

Por outro lado, essa não parece ser a única proteína envolvida na reação de plantas de fumo ao PVY. Tribodet et al. (2005), analisando a reação de necrose das plantas de fumo, criaram, experimentalmente, mutantes de PVY<sup>N-Wi</sup> que não induzem tal sintoma. Por meio de comparação do genoma entre os mutantes que causaram ou não sintoma de necrose, foi observado que a principal diferença entre tais isolados está presente na região C-terminal da proteína multifuncional HC-Pro, sugerindo, então, que ela seja a responsável pela indução de necrose nas plantas de fumo.

O envolvimento da HC-Pro na indução de sintomas na planta hospedeira também já foi relatado por Hu et al. (2009). Estes autores caracterizaram um isolado denominado L-26, que foi incapaz de induzir necrose em plantas de fumo, mas causou anéis necróticos em tubérculos de plantas de batata suscetíveis e apresentou a reação típica de PVY<sup>NTN</sup> nos testes sorológicos e moleculares. Por meio da comparação do genoma desse com outros isolados necróticos, observou-se que a diferença entre os genomas foi a substituição do nucleotídeo A-1627 para G-1627 na região HC-Pro, modificando o aminoácido de D-205 para G-205.

Da mesma forma, deve haver alguma alteração no genoma dos isolados PA-EP e SJ-CHI-1, aqui estudados, uma vez que é esperado que

isolados do tipo PVY<sup>N-Wi</sup> se portem biologicamente como a estirpe PVY<sup>N</sup>, induzindo reação de necrose nas plantas de fumo. Para a confirmação dessa suspeita, são necessários o sequenciamento e estudos envolvendo mutações nos prováveis genes envolvidos.

Outro resultado não esperado ocorreu com o isolado MF-AG-52, que reagiu com os anticorpos monoclonais para o PVY<sup>O</sup> (Mab2 e SASA-O), mas não com os que reconhecem as estirpes PVY<sup>N</sup> (SASA-N e 1F5), caracterizando-se como sorotipo O. Porém, na técnica de RT-PCR Multiplex, ele foi classificado como pertencente à estirpe NTN e não como PVY<sup>O</sup> ou PVY<sup>N-Wi</sup>. Além disso, apresentou uma banda de 995 pb no RT-PCR, quando foram utilizados *primers* específicos para outros dois isolados atípicos, descritos no Brasil por Galvino-Costa et al. (2011), denominados PVY-AGA e PVY-MON (classificados pelos autores como PVY<sup>E</sup>), que reagem com o antissoro 1F5 para estirpe necrótica do PVY.

Como esse padrão de comportamento não sugere nenhuma contaminação, considerando-se que a sorologia é baseada na produção de anticorpos específicos para a capa proteica de cada isolado, e a capa proteica do variante NTN é, na sua quase totalidade, proveniente da estirpe necrótica (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002), o esperado seria que ele não reagisse com os anticorpos MAb2 e SASA-O, para a estirpe comum, ficando difícil justificar a reação de um isolado NTN com esses anticorpos. Pelos testes biológicos, tal isolado induziu apenas sintoma de mosaico nas três cultivares de batatas testadas e, nas plantas de fumo cv. Turkshi NN, induziu mosaico, pontos necróticos e necrose nas nervuras. Chikh, Maoka e Natsuaki (2007) observaram reação sorológica atípica para um isolado sírio, que reagia tanto para o anticorpo monoclonal PVY<sup>O</sup> quanto para PVY<sup>N</sup>. Ao analisar a capa proteica desse isolado, os autores concluíram que a mudança em um aminoácido foi responsável pela sua reação sorológica.

Diante deste fato, especula-se que uma possível nova recombinação ou mutação tenha ocorrido no genoma do isolado MF-AG-52, podendo esse vir a ser um novo variante genético ainda não descrito. Porém, a confirmação dessa suspeita apenas se dará após o sequenciamento completo do genoma desse isolado e a investigação de possíveis recombinações gênicas.

A diversidade genética dos vírus que possuem RNA como componente genômico é muito comum e se dá por recombinação, mutação e rearranjo da partícula viral (ROOSSINCK, 2003; SIMON; BUJARSKI, 1994). O PVY é um exemplo dessa diversidade, pois, frequentemente, são descritos novos recombinantes, como no caso do isolado PVY<sup>NTN-NWi</sup>, descrito recentemente na Síria, que tem o genoma composto por recombinação entre PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N-Wi</sup>. Tal isolado reage sorologicamente para PVY<sup>O</sup>, porém, fenotipicamente, se porta como PVY<sup>NTN</sup>, induzindo necrose em tubérculos de plantas de batata suscetível (CHI ALI et al., 2010). Assim sendo, o diagnóstico e a caracterização de isolados de PVY tornam-se cada vez mais complexo.

À caracterização biológica devem ser somados os resultados das caracterizações sorológicas e moleculares para a completa classificação dos PVY estudados. Pela caracterização sorológica utilizando os antissoros policlonais UID8 (detecta todas as estirpes do PVY), MAb2 (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N:O</sup> e PVY<sup>C</sup>), 1F5 (PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O-O5</sup> e PVY<sup>NTN</sup>), SASA-N (PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup>) e SASA-O (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N:O</sup> e PVY<sup>C</sup>), foi possível observar que nenhum isolado apresentou características atípicas, como no caso dos isolados PVY<sup>E</sup> recentemente caracterizados no Brasil, PVY-AGA e PVY-MON que, apesar de serem isolados necróticos, não reagiram com um dos anticorpos específicos de PVY<sup>N</sup>, o SASA-N, portando um padrão sorológico único: MAb2 negativo/ SASA-O negativo/ 1F5 positivo/ SASA-N negativo (GALVINO-COSTA et al., 2011). Para os isolados brasileiros estudados aqui, apenas os dois padrões sorológicos típicos foram relatados como descrito a seguir: sorotipo O

(incluindo-se os isolados PVY<sup>O</sup> e os isolados do variante PVY<sup>N-Wi</sup>), descrito como MAb2 positivo/ SASA-O positivo/ 1F5 negativo/ SASA-N negativo, e o sorotipo N (incluindo os isolados de PVY<sup>NTN</sup>), descrito pela reação MAb2 negativa/ SASA-O negativa/ 1F5 positiva/ SASA-N positiva.

## 5 CONCLUSÕES

- a) a grande maioria dos isolados detectados nos campos produtores de batata de Minas Gerais foi do tipo PVY<sup>NTN</sup>, seguido pelo PVY<sup>N-Wi</sup>, mostrando a sua prevalência no campo;
- b) para a correta classificação dos variantes genéticos do PVY, houve a necessidade de se combinar o resultado das três técnicas: biológica, sorológica e molecular;
- c) os isolados PA-EP de Pouso Alegre e SJ-CHI-1 de Santa Juliana, caracterizados como PVY<sup>N-Wi</sup> por RT-PCR, não se comportaram como tal no teste biológico, não induzindo necrose em fumo, devendo ser análogo ao PVY<sup>N-Wi-minus</sup>, já descrito na literatura;
- d) o isolado MF-AG-52 apresentou comportamento diferente, tendo sido caracterizado como PVY<sup>NTN</sup> nos testes biológicos e RT-PCR e como PVY<sup>O</sup> no teste sorológico, tratando de um possível novo variante genético.

## REFERÊNCIAS

ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria, 2010. 427 p.

AYME, V. et al. Molecular dissection of the Potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the pvr2 resistance allelic series in pepper. **Journal of General Virology**, London, v. 88, n. 5, p. 1594-1601, May 2007.

BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. **Potato Virus Y**. Kew: Commonwealth Mycology Institute, 1981. (Descriptions of Plant Viruses, 242). Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

CHIKH-ALI, M. et al. PVYNTN-NW, a novel recombinant strain of Potato virus Y predominating in potato fields in Syria. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 59, n. 1, p. 31-41, Jan. 2010.

CHIKH-ALI, M.; MAOKA, T.; NATSUAKI, K. T. A point mutation changes the serotype of Potato virus Y isolate: genomic determination of the serotype of PVY strains. **Virus Genes**, Norwell, v. 35, n. 2, p. 359-367, Oct. 2007.

CHRZANOWSKA, M. New isolates of the necrotic strain of potato vírus Y (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. **Potato Research**, Wageningen, v. 34, n. 2, p. 179-182, Apr. 1991.

ELLIS, P et al. Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 18, n. 1, p. 64-70, Mar. 1996.

GALVINO-COSTA, S. B. F. et al. A novel type of Potato virus Y recombinant genome determined for the genetic strain PVY<sup>E</sup>. **Plant Pathology**, Honolulu, 2011. In press.

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 2, p. 363-378, Feb. 2002.

GRAY, S. et al. An evolution concern for potatoes crops in the United States and Canada. **Plant Disease**, Quebec, v. 94, n. 12, p. 1384-1397, Dec. 2010.



HU, X. et al. Molecular characterization and detection of recombinant isolates of potato virus Y from China. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 8, p. 1303-1312, Aug. 2009.

KARASEV, A. V. et al. Genetic diversity of the ordinary strain of *Potato virus Y* (PVY) and origin of recombinant PVY strains. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 7, p. 778-785, July 2011.

\_\_\_\_\_. Serological properties of ordinary and necrotic isolates of Potato virus Y: a case study of PVYN misidentification. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 87, n. 1, p. 1-9, 2010.

KERLAN, C. et al. Identification of the molecular make-up of the *Potato virus Y* strain PVYZ: genetic typing of PVYZ-NTN. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 9, p. 1052-1060, Sept. 2011.

LE ROMANCER, M.; KERLAN, C.; NEDELLEC, M. Biological characterisation of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 138-144, Mar. 1994.

\_\_\_\_\_. NE-11 represents a new strain variant class of potato virus Y. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 3, p. 517-525, Mar. 2008.

LORENZEN, J. H. et al. Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. **Archives of Virology**, New York, v. 151, n. 6, p. 1055-1074, June 2006.

MCDONALD, J. G.; KRISTJANSSON, G. T. Properties of strains of potato virus YN in North America. **Plant Disease**, Quebec, v. 77, n. 1, p. 87-89, Jan. 1993.

MOURY, B. et al. Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence towards recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 3, p. 322-329, Mar. 2004.

ROOSSINCK, M. J. Plant RNA virus evolution. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 406-409, Dec. 2003.

SIMON, A. E.; BUJARSKI, J. J. RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 337-362, 1994.

SINGH, R. P. et al. Discussion paper: the naming of Potato virus Y strains infecting potato. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

TRIBODET, M. et al. Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *N. tabacum* cv. Xanthi. **Journal of General Virology**, London, v. 86, n. 7, p. 2101-2105, July 2005.

VALKONEN, J. P. T. Potato viruses: economical losses and biotechnological potential. In: VIOLA, R. et al. (Ed.). **Potato biology and biotechnology**. San Diego: Elsevier, 2007. p. 619-641.

### CAPITULO 3

#### COMPORTAMENTO DA CULTIVAR Ágata A DIFERENTES ESTIRPES E VARIANTES DE *Potato virus Y* (PVY)

#### RESUMO

O *Potato virus Y* (PVY), que tem sido detectado em altas incidências nos campos produtores de batata, apresenta grande variabilidade genômica, que reflete na diversidade de sintomas induzidos nas diferentes cultivares de batata. A cv. Ágata tem sido a mais plantada no Brasil por apresentar boa produtividade e resistência de campo ao PVY. Entretanto, apesar de essa resistência ser importante para garantir a sua produtividade, a ausência de sintomas na planta infectada pode significar a existência de fonte de inóculo que pode passar despercebida, causando grandes prejuízos para os produtores de batata semente. Visando determinar a reação da cv. Ágata a isolados de PVY detectados no estado de Minas Gerais, neste trabalho, 31 isolados desse vírus foram inoculados mecanicamente nas plantas de batata cv. Ágata e os sintomas induzidos foram observados por três gerações consecutivas. Dois isolados do tipo PVY<sup>N-wi</sup> tiveram o seu genoma completamente sequenciado e analisado. Um isolado do tipo PVY<sup>N-wi</sup>, AD-AG-2, e mais três isolados pertencentes ao variante PVY<sup>NTN</sup>, ALF-VI, MF-AG-105 e SGOT-AR, não induziram sintomas visíveis nas plantas infectadas na primeira geração, mas induziram mosaico na segunda e na terceira gerações. Os demais isolados induziram sintomas que variaram de fraco a severo e, de modo geral, os sintomas se intensificaram a cada geração. Dois isolados tiveram seu genoma sequenciado e comparado com o genoma de outros dois isolados na tentativa de correlacionar possíveis modificações genômicas responsáveis pela indução ou não do sintoma na cv. Ágata. E, embora esses quatro isolados comparados tenham induzido diferentes reações na cv. Ágata, não foram encontradas grandes diferenças na sequência de nucleotídeos e aminoácidos.

Palavras chave: *Potato virus Y* (PVY). Sintomatologia. Ágata. Mosaico. Genoma.

## ABSTRACT

The Potato virus Y (PVY), strongly detected in potato crop fields, features a large genomic variability, reflecting into the diversity of induced symptoms in different potatoes cultivars. The cultivar Ágata has been the most planted in Brazil, presenting a good productivity and field resistance to PVY. However, despite such resistance is important to ensure its productivity, absence of symptoms in infected plants can result in a source of inoculum which can pass unnoticed, causing huge losses for seed potatoes producers. To determine the cv. Ágata reaction to PVY isolates detected in Minas Gerais state, 31 isolates were mechanically inoculated in potato plants cv. Ágata, and induced symptoms were observed for three consecutive generations. Two isolates from PVY<sup>N-Wi</sup> group had their genome completely sequenced and analyzed. An isolate from PVY<sup>N-Wi</sup> group: AD-AG-2, and three more isolates belonging to variant PVY<sup>NTN</sup>: ALF-VI, MF-AG-105 and SGOT-AR do not induced visible symptoms in infected plants in the first generation, but induced mosaic in the second and third generations. The remaining isolates induced symptoms that ranged from weak to severe and, in general, the symptoms intensified every generation. Two isolated had their genome sequenced and compared with the genome of two other isolated in an attempt to possibly correlate the genetical modifications or not responsible for the induction of symptom in cv. Ágata. Although these four compared isolates induced different reactions in the cv. Ágata, there were no significant differences in the sequence of nucleotides and amino acids.

Keywords: Potato virus Y (PVY). Symptomatology. Ágata. Mosaic. Genome.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a batata pode ser cultivada o ano inteiro, o que favorece a distribuição e a propagação de doenças, uma vez que as suas condições climáticas são altamente favoráveis à propagação e à disseminação dessas doenças no campo. Devido à degenerescência de tubérculos de batata, ocasionada por infecções viróticas, o Brasil importa, anualmente, cerca de 3 mil toneladas de batata semente (ANUÁRIO..., 2011), o que significa um risco permanente de introdução de novos vírus e estirpes exóticas.

O *Potato virus Y* (PVY) infecta várias plantas da família *Solanaceae* e é considerado o principal vírus da cultura da batata, podendo provocar perdas da ordem de 10% a 80%, dependendo da estirpe (ÁVILA; MELO; LEITE, 2007). Assim sendo, é considerado um entrave no comércio de tubérculos sementes de batata (*Solanum tuberosum L.*), principalmente devido ao fato de ela ser propagada vegetativamente, pois um tubérculo infectado dará origem a uma planta também infectada. Uma vez presente no campo, o PVY pode ser transmitido de forma não persistente por afídeos, sendo o *Myzus persicae* o mais eficiente (BOKX, 1987).

Os sintomas induzidos por esse vírus são variáveis, mas, de modo geral, induzem mosaico, clorose, mosqueado e deformação foliar, além da combinação desses sintomas (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994). Eles dependem da cultivar de batata, das condições ambientais e da estirpe e/ou do variante genético que, nesse vírus, aparece com uma alta frequência. Com base na reação de diferentes cultivares de batata e de plantas de fumo, cinco grupos de estirpes do PVY têm sido descritos: PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>E</sup> e PVY<sup>Z</sup>. Dentro desses grupos existem ainda diversos variantes genéticos, como PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>N-Wi</sup>, PVY<sup>NE-11</sup> (SINGH et al., 2008).

Essa variabilidade, não raramente, influencia a escolha das cultivares de batata a serem plantadas. Em meados da década de 1990, as cultivares Achat e Baraka eram as duas mais plantadas em Minas Gerais, devido à sua produtividade e rusticidade. Entretanto, com a introdução de isolados de PVY<sup>N-Wi</sup> via sementes infectadas importadas da Europa, a sua utilização tornou-se economicamente inviável, passando a ‘Monalisa’ a assumir a liderança entre as cultivares mais plantadas no Brasil (GERALDINO; BARBOSA; FIGUEIRA, 2006) Nova introdução ocorreu, da estirpe PVY<sup>NTN</sup>, e, uma vez mais, essa cultivar, que é altamente suscetível a anéis necróticos, foi substituída por outras cultivares mais resistentes.

Entre as cultivares mais plantadas no Brasil, a batata ‘Ágata’ tem assumido a liderança nos últimos anos, ocupando, atualmente, 57% da área total nacional (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA - ABBA, 2010). Como qualidades desta cultivar, destacam-se o tamanho e o formato dos tubérculos, ciclo precoce e elevado rendimento, além de não apresentar sintomas característicos quando infectada por algumas estirpes do PVY, tornando-se uma fonte de inóculo que passa despercebida no campo (BOKX; HUTTINGA, 1981). Isso se torna um motivo de preocupação, uma vez que dificulta a tomada de medidas de controle básicas, como propagar material sadio e efetuar o “roguing” de plantas doentes em campos de produção de sementes.

Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a reação da cultivar Ágata, quando inoculada com os principais variantes genéticos do PVY presentes nos campos produtores de batata do estado de Minas Gerais em 2010/2011, visando avaliar a rastreabilidade desse vírus em campos plantados com essa cultivar. Em adição, investigou-se, ainda, a concentração viral desses isolados em três plantios sucessivos de tubérculos da cv. Ágata infectados, na primeira geração, com os isolados de PVY detectados

e estudados. Quatro representantes desses isolados foram completamente sequenciados e analisados, com o objetivo de fazer inferências sobre a sua correlação com os diferentes sintomas mostrados pelas plantas.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Condução dos experimentos**

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV-MG) e no Laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **2.2 Origem, denominação e armazenamento dos isolados**

Foram utilizados 31 isolados de PVY neste estudo, sendo 25 deles caracterizados pelo presente autor, no ano de 2011 e seis caracterizados previamente e pertencentes à coleção de vírus do Laboratório de Virologia da UFLA. Na Tabela 1 estão reunidos os 31 isolados utilizados, a cidade e a cultivar de origem e sua respectiva classificação dentro das estirpes e variantes genéticas da espécie PVY.

Os isolados foram mantidos em folhas infectadas, dessecadas e armazenadas, a -20 °C, e ou congelados, a -80 °C, em ultrafreezer. Sempre que necessário, eles foram multiplicados por meio de inoculação mecânica em plantas de fumo cv. Turkish NN, sob condições de casa de vegetação.



Tabela 1 Isolados do PVY utilizados, cidade e cultivar de origem e classificação genética

ISOLADO	ORIGEM	CULTIVAR	ESTIRPE/VARIANTE
AD-AG-1	ANDRADAS	Ágata	PVY <sup>N-Wi</sup>
AD-AG-2	ANDRADAS	Ágata	PVY <sup>N-Wi</sup>
AD-AG-3	ANDRADAS	Ágata	PVY <sup>N-Wi</sup>
ALF-VI*	ALFENAS	Vivaldi	PVY <sup>NTN</sup>
ARA-MO*	ARAXÁ	Monalisa	PVY <sup>NTN</sup>
CA-AG-1	CAMPOS ALTOS	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
CA-AG-2	CAMPOS ALTOS	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
COR-AG*	COROMANDEL	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
DMO-AG-1	DELFIN MOREIRA	Ágata	PVY <sup>O</sup>
DMO-AG-2	DELFIN MOREIRA	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
IND-AG-1	INDIANOPOLIS	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
IND-AG-2	INDIANOPOLIS	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
IPU-MA*	IPUIUNA	Markies	PVY <sup>NTN</sup>
MF-AG-42	MARIA DA FÉ	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
MF-AG-52	MARIA DA FÉ	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
MF-AG-103	MARIA DA FÉ	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
MF-AG-105	MARIA DA FÉ	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
MV-CL	MONTE VERDE	Clone	PVY <sup>NTN</sup>
OF-CHIP	OURO FINO	Chipie	PVY <sup>NTN</sup>
PA-EP	POUSO ALEGRE	Excelente pouso	PVY <sup>N-Wi</sup>
PER-AG-50	PERDIZES	Ágata	PVY <sup>N-Wi</sup>
PER-AG-60	PERDIZES	Ágata	PVY <sup>N-Wi</sup>
SA-CL	SENADOR AMARAL	Clone	PVY <sup>NTN</sup>
SAC-AG	SACRAMENTO	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
SAT-AG*	SACRAMENTO	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
SGOT-AR	SÃO GOTARDO	Arrow	PVY <sup>NTN</sup>
SJ-CHI-1	SANTA JULIANA	Chipie	PVY <sup>N-Wi</sup>
SJ-CHI-2	SANTA JULIANA	Chipie	PVY <sup>NTN</sup>
SS-AG-1	SERRA DO SALITRE	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
SS-AG-2	SERRA DO SALITRE	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>
TAP-AG*	TAPIRA	Ágata	PVY <sup>NTN</sup>

\*Isolados pertencentes à coleção de virologia da UFLA

### **2.3 Sintomatologia induzida na cultivar Ágata pelos diferentes variantes de PVY**

A avaliação de sintomas do vírus nas plantas da cv. Ágata foi realizada de forma comparativa entre os isolados estudados, durante três gerações sucessivas, em condições de casa de vegetação.

Na primeira geração, os tubérculos sadios da cv. Ágata foram submetidos à quebra de dormência com bissulfureto de carbono, na concentração de 25 ml/m<sup>3</sup>, por 72 horas. Após brotação, foram plantados em vasos de 5 kg e, logo após a germinação, as plantas foram analisadas por meio do teste sorológico DAS-ELISA, para comprovação da sua sanidade. No estágio de quatro a cinco folhas, as plantas comprovadamente sadias foram inoculadas mecanicamente, utilizando-se o tampão fosfato 0,01M, pH 7, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade, com os diferentes isolados estudados. O experimento foi constituído por blocos casualizados, com uma planta por parcela e quatro repetições, totalizando 120 plantas, que foram mantidas em casa de vegetação para posterior observação dos sintomas e coleta dos tubérculos no final do ciclo (fevereiro a abril de 2011). Na avaliação dos sintomas, esses foram classificados em ausentes, fracos, médios e severos.

Na segunda geração, os tubérculos colhidos foram replantados, após quebra de dormência, e reanalisados conforme descrito anteriormente. O mesmo procedimento foi empregado para obter as plantas de terceira geração. O plantio na segunda geração foi feito no período de junho a agosto de 2011 e o da terceira geração feito de outubro a dezembro, visto que o ciclo da cv. Ágata dura, em média, três meses. Após a emergência na segunda e na terceira geração de plantas, os sintomas foram avaliados periodicamente e classificados conforme mencionado anteriormente.

## 2.4 Sequenciamento completo do genoma de isolados de PVY

Quatro isolados de PVY coletados em Minas Gerais, sendo dois do grupo PVY<sup>N-Wi</sup> (D-AG-2 e PA-EP) e dois do grupo PVY<sup>NTN</sup> (TAP-AG e ALF-VI), tiveram os seus genomas analisados em tentativas de correlacionar os sintomas observados nas plantas com as características genômicas de cada um. Os dois primeiros foram sequenciados neste trabalho e os dois outros já haviam sido sequenciados anteriormente.

Para o sequenciamento foi feita a extração do RNA e RT-PCR empregando-se uma série de *primers* específicos previamente listados por Hu et al. (2009), capazes de gerar 28 amplicons sobrepostos ao longo do genoma do vírus.

A extração do RNA foi feita a partir de folhas de fumo infectadas com PVY, seguindo o protocolo Dellaporta I e a RT-PCR foi realizada em dois passos separados, utilizando-se, para a síntese de cDNA, a enzima Superscript II (Invitrogen) e o *primer* oligo dT. Para a amplificação do DNA, utilizou-se o kit de alta performance LA Taq DNA polimerase (Takara Inc.), empregando-se 4 pares de *primers* desenhados para gerar dois grandes fragmentos. Após a amplificação desses dois fragmentos para cada um dos isolados propostos, estes foram purificados utilizando-se o Wizard SV Gel Kit PCR Clean Up System (Promega) ou o reagente ExoSap (USB).

Após a purificação, os cDNAs foram enviados para sequenciamento na Genewiz Inc. e as sequências obtidas foram unidas com o auxílio do programa DNABaser. As sequências finais foram analisadas pelo programa BLAST e os alinhamentos múltiplos foram feitos pelo programa CLUSTALW2, utilizando-se, para comparação, alguns dos isolados de PVY disponíveis no *GenBank* (Tabela 2). As árvores filogenéticas foram construídas por meio do programa MEGA 4.0 (MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS -

MEGA, 2011) com bootstrap, considerando valores superiores a 2.000 repetições.

Tabela 2 Relação dos isolados do *Potato virus Y* (PVY) disponíveis no *GenBank*, empregados para a comparação das sequências genéticas com as sequências dos isolados estudados

ACESSO	ORIGEM	ISOLADO	ESTIRPE/ VARIANTE	AUTOR/ PUBLICAÇÃO
AJ890344	ALEMANHA	DITTA	PVY <sup>NTN</sup>	Schubert et al. (2007)
AY166866	CANADÁ	Tu 660	PVY <sup>NTN</sup>	Nie e Singh (2003)
U09509	CANADÁ	139	PVY <sup>O</sup>	Singh et al. (1997)
EU182576	CHINA	SD1	PVY <sup>N</sup>	Wen et al. (2010)
HQ631374	CHINA	HN1	PVY <sup>NTN</sup>	Hu et al. (2011)
AJ890348	FRANÇA	Adgen	PVY <sup>C</sup>	Schubert et al. (2007)
DQ157180	EUA	NE-11	PVY <sup>N</sup>	Piche et al. (2006)
AY884984	EUA	RRA 1	PVY <sup>NA/NTN</sup>	Lorenzen et al. (2006)
AY884982	EUA	423-3	PVY <sup>NTN</sup>	Lorenzen et al. (2006)
AF463399	EUA	NM	NM	Fellers et al. (2002)
AY884983	EUA	Mont	PVY <sup>N</sup>	Lorenzen et al. (2006)
EF026074	EUA	Oz	PVY <sup>O</sup>	Baldauf et al. (2006)
AY884985	EUA	Alt	PVY <sup>N-Wi</sup>	Lorenzen et al. (2006)
DQ008213	EUA	PN10A	PVY <sup>N:O</sup>	Lorenzen et al. (2005)
FJ666337	POLÔNIA	N Nysa	PVY <sup>N</sup>	Golnik, Szyndel e Chrzanowska (2009)
AJ890349	POLÔNIA	LW	PVY <sup>O</sup>	Schubert et al. (2007)

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Sintomatologia induzida nas plantas da cv. Ágata pelas estirpes/ variantes de PVY estudados

Os sintomas induzidos nas plantas cv. Ágata estão representados na Tabela 2. Um isolado do tipo PVY<sup>N-Wi</sup>, AD-AG-2, e mais três isolados pertencentes ao variante PVY<sup>NTN</sup>, ALF-VI, MF-AG-105 e SGOT-AR, não induziram sintomas visíveis nas plantas infectadas na primeira geração. Assim sendo, não se pode correlacionar o variante genético do PVY com a intensidade de sintomas apresentada pela planta de batata cv. Ágata infectada, mesmo porque alguns isolados pertencentes ao variante PVY<sup>NTN</sup> foram capazes de induzir sintomas que variaram de fracos a severos. Os sintomas, de modo geral, se intensificaram da segunda geração em diante, indicando correlação com a concentração de vírus nas plantas. Nota-se, entretanto, que a maioria dos isolados do tipo PVY<sup>N-Wi</sup>, que foram inoculados, induziram sintomas leves a intermediários, até a terceira geração. Considerando-se que, geralmente, a concentração de inóculo é maior nas inoculações mecânicas do que na inoculação com vetores. Provavelmente, no campo, essas plantas, quando inoculadas pelo vetor, também não mostrariam sintomas.

Conforme era esperado, nenhum dos isolados aqui estudados foi capaz de induzir sintoma de anéis necróticos nos tubérculos da 'Ágata', mesmo o vírus estando presente em elevadas concentrações nos tubérculos e após longos períodos de armazenamento em câmara fria.

Tabela 2 Sintomas induzidos pelos isolados de PVY estudados nas plantas de batata cv. Ágata

ALF-VI	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	SS	M+	M+
ISOLADO	SOROTIPO	ESTIRPE GENÉTICA	1 <sup>a</sup> GERAÇÃO	2 <sup>a</sup> GERAÇÃO	3 <sup>a</sup> GERAÇÃO
AD-AG-1	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>	M	M +	M +
AD-AG-2	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>	SS	M	M
AD-AG-3	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>	M	M	M+
PA-EP	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>	M	M +	M+
PER-AG-50	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>	M	M ++	M++
PER-AG-60	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>	M	M ++	M++
SJ-CHI-1	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>N-Wi</sup>	M+	M +	M+
ALF-VI	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	SS	M+	M+
ARA-MO	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M+	M +	M+
CA-AG-1	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M ++	M++
CA-AG-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M ++	M++
DMO-AG-1	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>O</sup>	M	M +	M+
COR-AG	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M	M
DMO-AG-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M+	M ++	M++
IND-AG-1	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M ++	M++
IND-AG-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M ++	M++
IPU-MA	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M +	M+
MF-AG-52	PVY <sup>O</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M +	M
MF-AG-42	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M ++	M++
MF-AG-103	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M +	M+
MF-AG-105	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	SS	M	M+
MV-CL	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M ++	M++
OF-CHIP	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M+	M +	M++
SA-CL	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M ++	M ++	M++
SAC-AG	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M +	M+
SAT-AG	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M +	M+
SGOT-AR	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	SS	M +	M++
SJ-CHI-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M ++	M ++	M++
SS-AG-2	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M +	M ++	M++
SS-AG-1	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M +	M ++	M++
TAP-AG	PVY <sup>N</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	M	M ++	M++

SS: sem sintoma; M: mosaico fraco; M +: sintomas intermediários; M ++ sintomas severos

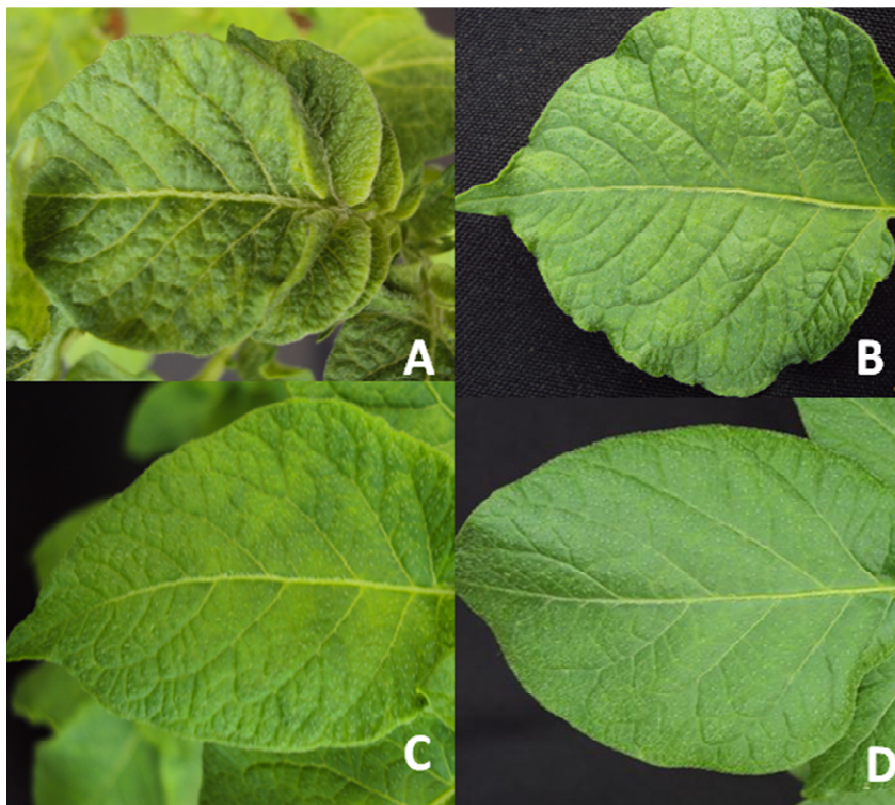


Figura 1 Sintomas do PVY em folhas de batata cv. Ágata. A: mosaico severo; B: mosaico intermediário; C: mosaico fraco; D: sem sintoma

### 3.2 Sequenciamento e análise dos genomas

Foram analisados quatro isolados de PVY, sendo dois deles coletados e sequenciados em 2011, neste trabalho, o PA-EP e AD-AG-2, pertencentes ao variante PVY<sup>N-wi</sup>, e dois pertencentes à coleção de vírus da UFLA, TAP-AG e ALF-VI, sequenciados anteriormente e classificados como sendo do tipo PVY<sup>NTN</sup>. Esses isolados foram escolhidos porque AD-AG-2 e ALF-VI não induziram sintomas quando inoculados mecanicamente em plantas da cv.

Ágata, na primeira geração, enquanto os outros dois induziram mosaico na primeira geração, que aumentou de intensidade nas gerações seguintes.

No alinhamento múltiplo, tanto a identidade de nucleotídeos entre os dois isolados do tipo PVY<sup>N-Wi</sup> como a identidade entre os dois isolados PVY<sup>NTN</sup> foram de 99%, enquanto a identidade entre os isolados Wilga e NTN foi de 91% (Tabela 3). Quando os isolados Wilga foram comparados com isolados semelhantes (Wilga e N:O) do *GenBank* (Tabela 2), a identidade foi de 97%, enquanto as identidades com os isolados comuns variaram de 94% a 97%, com isolados necróticos de 84% a 92% e com os recombinantes NTN e NA/NTN foi de 91% e 85%, respectivamente. Comparando-se os dois isolados NTN com os outros semelhantes do *GenBank* (Tabela 2), a identidade com isolados variou de 90% a 99%. A identidade com o isolado NA/NTN foi de 90%, com isolados de PVY<sup>N</sup> variou de 91% a 97% e com isolados comuns, de 99% a 91%.

A identidade de aminoácidos entre os isolados Wilga estudados também foi de 99% e, entre esses e os isolados NTN, foi de 95%. Quando comparados com os isolados semelhantes (Wilga e N:O) do *GenBank*, as similaridades foram de 97% e 98%, respectivamente. A identidade entre esses e os comuns do *GenBank* variou de 96% a 97%; entre esses e os necróticos de 93% a 95% e entre eles e os variantes NTN, de 92% a 95%.



Tabela 3 Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos do genoma dos isolados TAP-AG, ALF-VI, AD-AG-2, PA-EP, em comparação com a sequência de outros dezesseis isolados de PVY depositados no *GenBank*

aa \ nt	ALT Wi	MONT N	OZ O	423-3 NTN	PN10A N:O	AD-AG-2	PA-EP	TAP-AG	ALF-VI	NE-11
ALT Wi		88	94	94	97	97	97	93	93	87
MONT-N	95		83	93	87	86	86	93	93	96
OZ-O	95	91		88	95	96	95	88	88	93
423-3-NTN	97	97	93		92	91	91	99	99	92
PN10A- N:O	98	94	96	93		97	97	92	92	86
AD-AG-2- Wi	97	93	97	95	98		99	91	91	85
PA-EP- Wi	97	93	97	95	98	99		91	91	85
TAP-AG -NTN	97	97	93	99	95	95	95		99	91
ALF-VI- NTN	97	97	93	99	95	95	95	99		92
NE-11- N	95	99	91	97	94	93	93	97	97	
TU660-NTN	93	97	91	95	93	92	92	95	95	97
RRA-NA/NTN	94	98	91	96	93	92	93	95	96	98
DITTA NTN	96	97	93	99	95	94	94	98	98	96
N NYSA N	97	96	93	98	96	95	95	98	98	96
SDI N	97	95	93	97	96	95	95	97	97	95
LW O	97	93	95	95	98	97	97	95	95	93
O 139 0	94	90	98	92	95	96	96	92	92	90
Adgen C	93	91	95	92	93	93	93	92	92	91
HN1 NTN	97	97	93	99	96	95	95	99	99	97
NM	91	90	93	91	92	92	92	91	91	90

Tabela 3, conclusão

aa	nt	TU660	RRA	DIT TA	N Nysa	SDI	LW	O 139	Adgen	HN1	NM
ALT Wi		86	86	93	94	93	97	92	87	94	85
MONT-N		96	96	93	82	88	86	82	84	93	82
OZ-O		83	83	88	89	88	94	97	90	89	86
423-3-NTN		90	90	99	97	92	92	88	86	99	84
PN10A- N:O		85	85	92	93	92	98	93	88	92	85
AD-AG-2- Wi		84	85	91	92	91	97	94	88	91	85
PA-EP- Wi		84	85	91	92	91	97	94	88	91	85
TAP-AG -NTN		90	90	98	97	92	91	88	86	98	84
ALF-VI- NTN		90	90	99	97	92	91	88	86	99	83
NE-11- N		95	95	91	91	87	86	83	83	91	82
TU660-NTN			99	90	90	86	85	82	84	90	82
RRA-NA/NTN		99		90	90	86	85	83	83	90	83
DITTA NTN		95	95		97	92	91	88	86	90	84
N NYSA N		95	95	98		93	92	89	86	97	84
SDI N		94	94	96	97		92	88	85	92	82
LW O		92	92	95	95	95		93	88	92	85
O 139 0		90	90	92	93	92	94		89	88	86
Adgen C		92	92	92	92	92	92	94		86	88
HN1 NTN		95	96	98	98	97	95	92	92		85
NM		90	90	91	91	91	91	92	93	91	

A árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos mostrou a formação de dois grandes clados, com os isolados Wilga, aqui estudados, se agrupando em um deles, juntamente com os isolados comuns, EF026074 dos Estados Unidos, U09509 do Canadá e o AJ890349 da Polônia, com o qual se mostrou mais estreitamente relacionado. Um isolado necrótico de PVY, denominado de NM, o AF-463399, originado dos Estados Unidos, também se agrupou no mesmo clado, embora em um segundo subgrupo, onde permaneceu isolado. O isolado Wilga, AY884985, dos Estados Unidos, utilizado neste trabalho para comparação, ficou agrupado no segundo clado, próximo aos isolados NTN estudados neste trabalho e os demais isolados utilizados para comparação. O isolado NTN, que apresentou maior proximidade dos isolados NTN estudados nesse trabalho, foi o AY884982, dos Estados Unidos.

A árvore obtida quando se fez o alinhamento dos aminoácidos apresentou maior número de subdivisões com os isolados AF-463399 e U09509, isolados em dois clados e os demais, no terceiro clado. Este, por sua vez, se subdividiu em dois gsubgrupos, um contendo um isolado de PVY<sup>C</sup>, o AJ890348, e o segundo, contendo os demais isolados. Novamente, os isolados Wilga aqui estudados se agruparam perto dos mesmos isolados dos Estados Unidos, Canadá e Polônia, dessa vez um pouco mais perto do isolado AY884985, embora em ramos separados do mesmo subgrupo. Os isolados tipo NTN também ficaram mais próximos dos isolados semelhantes.

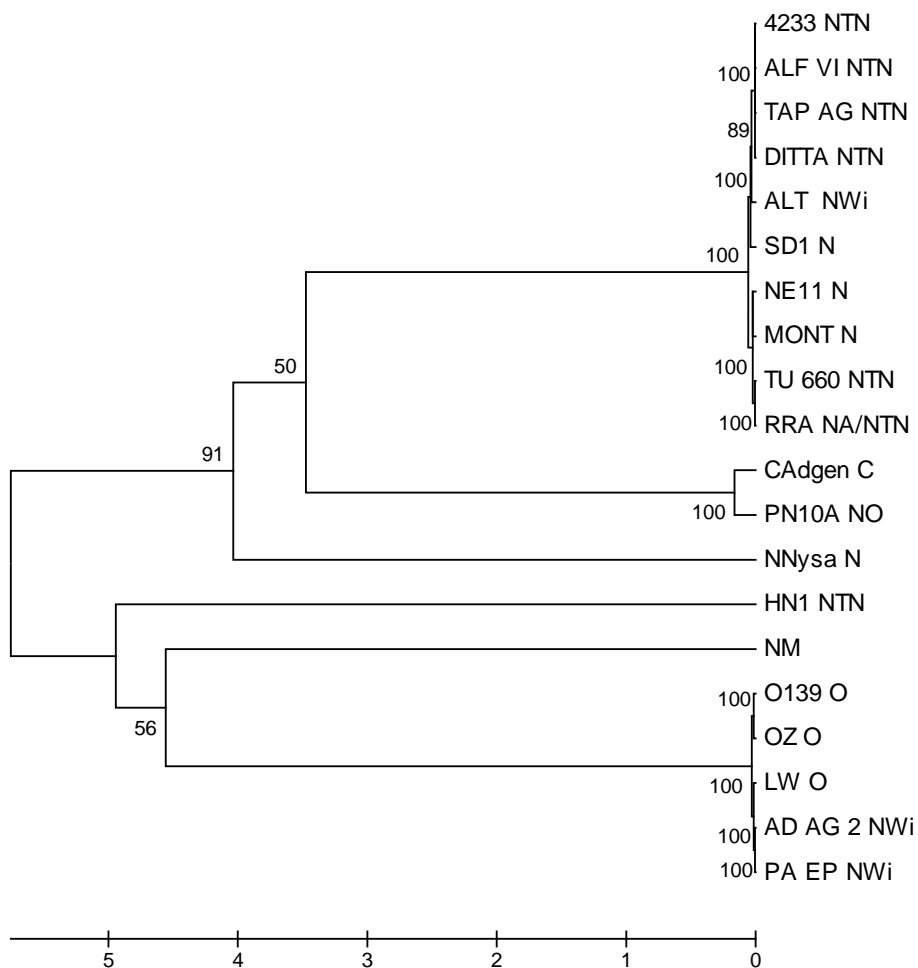


Figura 2 Árvore filogenética obtida com base na sequência de nucleotídeos dos isolados PA-EP, AD-AG-2, TAP-AG e ALF- VI, comparados com os isolados disponíveis no *GenBank*. Os valores de bootstrap foram obtidos por meio do programa MEGA, UPGMA, com 2.000 repetições

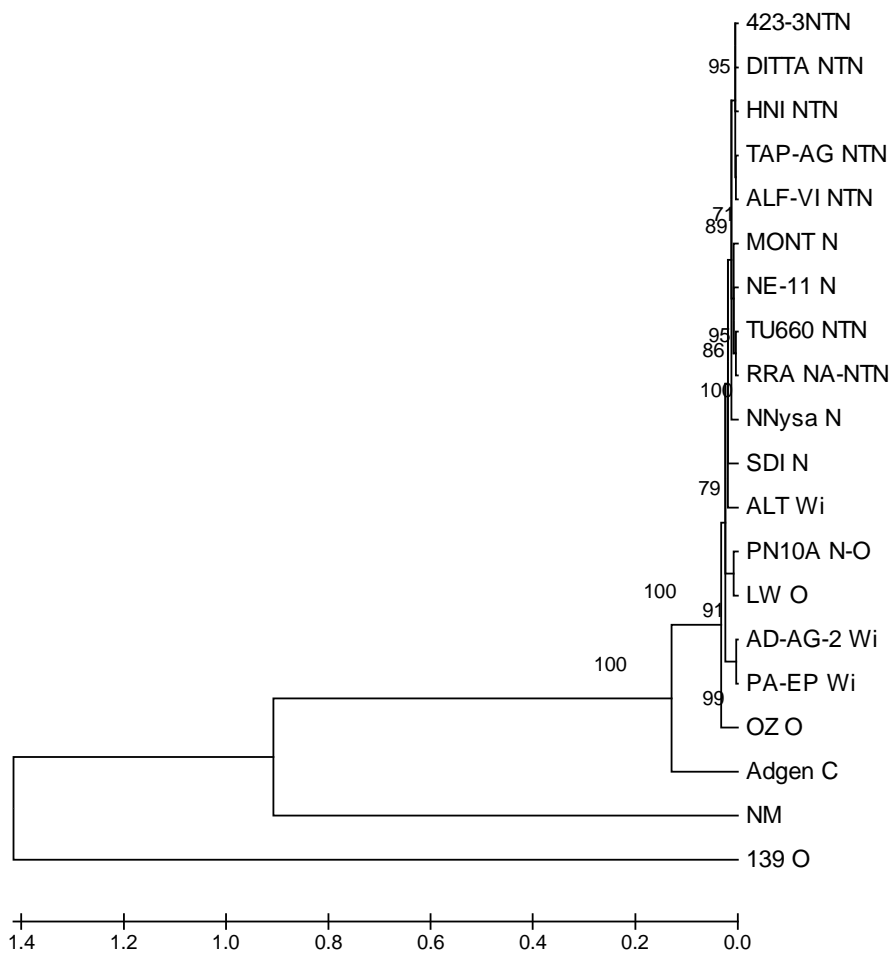


Figura 3 Árvore filogenética obtida com base na sequência de aminoácidos dos isolados estudados comparados com os isolados disponíveis no *GenBank*. Os valores de bootstrap foram obtidos por meio do programa MEGA, Neighbor Joining, com 2.000 repetições

#### 4 DISCUSSÃO

De modo geral, observou-se que os isolados Wilga apresentaram tendência de induzir sintomas mais leves na cv. Ágata, nas três gerações. Isso também foi observado para outras cultivares (CHRZANOWSKA, 1991; 1994; FIGUEIRA, 1999). Sabe-se que os sintomas induzidos por PVY podem variar com o genótipo e a idade do hospedeiro, a estirpe e a concentração do vírus e fatores ambientais, como temperatura, podendo variar desde infecção latente até necrose pronunciada de folhas e morte das plantas (BOKX; PIRON, 1990).

Com a alta variabilidade genômica do PVY, frequentemente, novos isolados têm sido encontrados em diversas partes do mundo. Os primeiros relatos sobre a estirpe PVY<sup>N-Wi</sup> foram feitos por Chrzanowska (1991, 1994), quando estudou um novo isolado de PVY<sup>N</sup>, detectado em 1984, na cv. 'Wilga', em campos do nordeste da Polônia, que ocorria em altas concentrações nas plantas de batata e era altamente disseminável no campo. Segundo este autor, esse isolado induzia sintomas leves de mosaico, em comparação com os isolados conhecidos anteriormente, além de não reagir com o anticorpo monoclonal específico para PVY<sup>N</sup>, produzido pela Bioreba. Esse isolado foi capaz de infectar cultivares resistentes ao PNY<sup>N</sup>, causando grandes prejuízos nas lavouras de batata.

Em outros locais onde esse vírus ocorre, o mesmo problema tem sido observado. Gray et al. (2010) observaram que, geralmente, PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N-Wi</sup> tendem a induzir sintomas menos severos nas lavouras dos Estados Unidos e do Canadá, na maioria das cultivares de batata, quando comparados ao isolados do tipo PVY<sup>O</sup>. Entretanto, neste trabalho, o isolado DMO-AG-1, classificado como PVY<sup>O</sup>, induziu sintoma de mosaico na cv. Ágata, que foi menos severo que alguns dos isolados NTN inoculados, demonstrando a grande variabilidade dos isolados de PVY.

Embora os dois isolados Wilga e os dois NTN estudados tenham induzido diferentes reações na cv. Ágata, na primeira geração, quando os seus genomas foram analisados, não foram encontradas grandes diferenças na sequência de nucleotídeos e aminoácidos. Assim sendo, infere-se que a não indução de sintomas pelos isolados AD-AG-2 (Wilga) e ALF-VI (NTN) na cv. Ágata pode ser devido a diferentes concentrações de vírus no inóculo empregado durante a transmissão mecânica ou se deve a pequenas diferenças nos aminoácidos da proteína viral, capazes de tornar os isolados mais ou menos infectivos durante a primeira geração da planta.

O fato de não apresentar sintomas ou apresentar sintomas leves, que podem passar despercebidos no campo, pode até ser vantajoso para o produtor de batata consumo, entretanto, é altamente prejudicial para o produtor de batata semente, que não reconhece as plantas infectadas na ocasião do “roguing” e pode estabelecer lavouras com altos índices de infecção nas proximidades de lavouras de outras cultivares mais suscetíveis, constituindo uma fonte de inóculo com alto potencial de disseminação. Gray et al. (2010) chamaram a atenção para o fato de que plantas com sintomas amenos passam despercebidas durante inspeções de campo, de modo que as plantas infectadas continuam sendo remultiplicadas, dando ao patógeno maior chance de se modificar geneticamente em plantios sucessivos. Segundo os mesmos autores, tal fato pode ter contribuído para um aumento da incidência dos recombinantes necróticos do PVY.

Assim sendo, no Brasil, onde a ‘Ágata’ é, atualmente, a cultivar mais plantada, provavelmente, o fato de ela não apresentar sintomas, além de estar propiciando o aparecimento de novos isolados geneticamente diferentes, deve estar sendo um fator de alto risco para os produtores de sementes que ainda não atentaram para esse problema.

## 5 CONCLUSÕES

- a) a maioria dos isolados do tipo PVY<sup>N-Wi</sup> e do tipo PVY<sup>NTN</sup> induziu sintomas na cultivar Ágata, sendo que isolados de cada tipo não induziram sintomas, tornando a correlação entre ausência de sintomas e variante genético inconsistente;
- b) de modo geral, os sintomas foram mais brandos na primeira geração, se intensificando nas gerações seguintes;
- c) os sintomas induzidos pelos isolados do tipo Wilga foram menos severos que os induzidos pelos isolados do tipo NTN;
- d) a comparação entre os genomas dos isolados que induziram e os que não induziram sintomas não apresentou diferenças significativas para explicar esse comportamento.



## REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria, 2010. 427 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA. Brasil: atuais variedades. **Revista Batata Show**, Itapetininga, ano 10, n. 28, p. 1, dez. 2010.
- ÁVILA, A. C.; MELO, P. E.; LEITE, L. R. O vírus Y da batata (Potato Vírus Y) e a batata-semente nacional: quem vencerá. **Revista Batata Show**, Itapetininga, v. 7, n. 17, p. 14-17, 2007.
- BOKX, J. A. Biological properties. In: BOKX, J. A.; WANT, D. E. van der (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2<sup>nd</sup> ed. Wageningen: PUDOC, 1987. p. 58-82.
- BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. **Potato Virus Y**. Kew: Commonwealth Mycology Institute, 1981. (Descriptions of Plant Viruses, 242). Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242>>. Acesso em: 10 nov. 2011.
- BOKX, J. A.; PIRON, P. G. M. Relative efficiency for a number of aphid species in the transmission of potato vírus Y<sup>N</sup> in the Netherlands. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 96, n. 4, p. 237-246, July 1990.
- CHRZANOWSKA, M. Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. **Phytopathologia Polonica**, Poznan, v. 8, n. 20, p. 15-20, 1994.
- \_\_\_\_\_. New isolates of the necrotic strain of potato vírus Y (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. **Potato Research**, Wageningen, v. 34, n. 2, p. 179-182, Apr. 1991.
- FELLERS, J. P. et al. The potato virus Y M(S)N(R) NIb-replicase is the elicitor of a veinal necrosis-hypersensitive response in root knot nematode resistant tobacco. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 3, n. 3, p. 145-152, May 2002.
- FIGUEIRA, A. R. Viroses da batata: situação atual e perspectivas futuras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 86-96, mar./abr. 1999.

GERALDINO, P. S. et al. Incidência de vírus em batata-semente no Estado de Minas Gerias. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UFLA-CIUFLA, 19.; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIC/CNPq, 19.; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIC/FAPEMIG, 19., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006. 1 CD-ROM.

GOLNIK, K.; SZYNDEL, M. S.; CHRZANOWSKA, M. Full sequence of Potato virus Y, isolate N Nysa. **Plant Pathology**, Warsaw, v. 166, 2009. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/COL7M3>>. Acesso em: 10 out. 2011.

GRAY, S. et al. An evolution concern for potatos crops in the United States and Canada. **Plant Disease**, Quebec, v. 94, n. 12, p. 1384-1397, Dec. 2010.

HU, X. et al. Molecular characterization and detection of recombinant isolates of potato virus Y from China. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 8, p. 1303-1312, Aug. 2009.

MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS. **MEGA. 4.0**. Disponível em: <<http://www.megasoftware.net/>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. **The Potiviridae**. Wallingford: CAB International, 1994. 516 p.

SINGH, R. P. et al. Discussion paper: the naming of Potato virus Y strains infecting potato. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 1, p. 1-13, Jan. 2008.

WEN, F. et al. Inhibiting virus infection by RNA interference of the eight functional genes of the potato virus Y genome. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v. 158, n. 11/12, p. 776-784, Nov. 2010.